



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**Promoción de crecimiento vegetal de
Bacillus subtilis EA-CB0575,
colonización rizosférica y potencial
genómico y bioquímico.**

Luisa Fernanda Posada Uribe

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Medellín, Colombia

2017

Promoción de crecimiento vegetal de *Bacillus subtilis* EA-CB0575, colonización rizosférica y potencial genómico y bioquímico.

Luisa Fernanda Posada Uribe

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Doctor en Biotecnología

Directora:

Ph.D. Valeska Villegas Escobar

Codirector:

Ph.D. Magally Romero Tabarez

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Medellín, Colombia

2017

A Fabián,

Gracias por ser la mano amiga, el amor incondicional, la palabra precisa y el mejor hombre que Dios pudo regalarme. Gracias por brindarme el tiempo que debí estar a tu lado para culminar este sueño que nos llevará a un futuro mejor en familia. Te amo.

a mi familia,

A mis padres y hermanas porque a pesar de no comprender para dónde iba este sueño, lo apoyaron y facilitaron todo para que se diera. A mi mamá por tantos años de esfuerzos y de oraciones para que todo saliera bien. Gracias a todos por la paciencia infinita cuando decía “Estaré en el laboratorio hasta tarde” ó “no puedo...tengo que trabajar en la tesis”. Aquí está el fruto del trabajo constante de estos años.

Gracias a Dios,

porque hubo momentos en los que creí que no lo iba a lograr, pero la perseverancia y la Fé permitieron que esto llegara a un buen final. Gracias por darme la fuerza para pasar los obstáculos.

Agradecimientos

Este trabajo no pudo ser posible sin la ayuda de muchas personas que consciente o inconscientemente aportaron al logro de mis objetivos. Agradezco a todas esas personas y entidades por permitirme desarrollar mi Doctorado de la mejor manera.

Gracias a la Universidad EAFIT por ser mi casa desde el 2001 hasta ahora. Estoy segura que mis mejores años quedan allí. Gracias por brindarme el espacio, los recursos y las comodidades para ejecutar todas las actividades: este siempre será mi hogar. Gracias especiales a Valeska Villegas, por ser la guía constante durante casi 12 años de trabajo juntas. Este trabajo es posible por su confianza en mí y por el empeño que como grupo de trabajo hemos mantenido. Gracias a los técnicos de laboratorio, A Jhon, a Mauricio, A Edgar y muy especialmente a Sigi, por que su ayuda fue vital en el desarrollo de mis actividades y porque en estos años de trabajo aprendimos a querernos y a ser buenos amigos. Agradezco a la Asociación de Bananeros de Colombia, AUGURA, por todo el apoyo recibido. Aprendí muchas cosas del cultivo y conocí gente invaluable que fue apoyo constante en mi trabajo. Espero sigan desarrollando el sector bananero con su aporte investigativo. Gracias a Colciencias, por medio de la convocatoria Doctorados Nacionales 528 de 2011, por la financiación de mis estudios.

A mis directores y asesores. A Magally Romero por ser ese angelito siempre presente, a Javier Correa por su sabiduría, caballerosidad y carisma; a Luz Estela González de Bashan por su apoyo basado en la experiencia y el conocimiento y porque sin conocerme creyó en mí. Al Dr. Yoav Bashan por su ayuda, quien junto con Luz Estela, me hicieron entender el mundo de la ciencia y me han dado la oportunidad de abrirme paso en él. Espero que el sueño de ustedes pueda unirse al mío y el futuro planeado juntos se haga realidad. Al personal del CIBNOR, a todos los compañeros y muy especialmente a Blanquita por su

ayuda desinteresada y oportuna. A Ariel Cruz por su colaboración con el SEM y toda su asesoría.

A mis estudiantes: Ana Carolina Pulido, Daniel Pérez, Nicolás Franco, Germán Santa María y Yessika Montoya. Gracias porque con sus trabajos me ayudaron a construir este sueño y me permitieron desarrollar la habilidad de dirigir. Gracias por su amistad y generosidad cuando necesité un apoyo. A las compañeras de siempre, María Ramírez y Sandra Mosquera por acompañarme en este reto. A los compañeros del día a día, a los que me ofrecieron su apoyo tantas veces que lo necesité y me hicieron llevadero el camino. A aquellas personas que con sus palabras y actitudes generaron un obstáculo en este camino..., porque me fortalecieron y me llevaron a entender la realidad que se vive en la sociedad y en la ciencia; pero también me demostraron que soy más fuerte que los obstáculos y que puedo salir adelante.

Al personal del Laboratorio de Patología de la Universidad de Antioquia, Natalia Ortiz, Yessica, Juliana, y todos quienes me apoyaron con el proceso de inclusión, embebimiento y corte de muestras. Gracias a Dios llegué a donde ustedes, se convirtieron en mis ángeles en un momento de total desesperación. A Camilo Ramírez y Jean Paul Delgado de la Facultad de Biología de la UdeA por todo su apoyo con el trabajo en el microscopio confocal. A Gustavo Bolaños de la Universidad de Caldas por su ayuda con el SEM. A Juan Pablo Cano y Alejandro Toro por su ayuda con el secado super crítico en la Universidad Nacional de Colombia. A Catalina Restrepo del proyecto de oleaginosas en la Universidad EAFIT por su apoyo con el cultivo *in vitro* de banano. A mis docentes en estos años de estudio, especialmente a Guillermo León Palacios, Mauricio Salazar y Mauricio Marín, por ser la viva muestra de que la docencia es pasión.

A las amigas de corazón que me vieron desfallecer y me dieron fuerzas para levantarme: Natalia Ochoa, Ana Cárdenas, Sara preciado, Diana Medina, Ana Ocampo y Norma Lagunas, Gracias porque cuando necesitaba que me dijeran que era capaz, no sólo me dijeron tú puedes sino que me acompañaron a poder!. Final y principalmente a mi familia: A Fabián que sufrió conmigo y estuvo siempre ayudándome, a mi familia política, a mis papás, hermanas, Simón y Tito por estar siempre ahí y tolerar la larga espera. Los amo!!! Sólo me resta decir: Uffff...POR FIN!!!

Resumen

Cultivos de interés agrícola como el banano y el tomate son de importancia económica a nivel mundial y con el fin de abastecer la demanda, emplean agroquímicos que reducen la presencia de enfermedades y mantienen su productividad. Sin embargo, el uso extensivo de estos productos genera problemas ambientales y sociales como la contaminación de aire y fuentes de agua, erosión de suelos y acumulación de nitratos y nitritos en el ambiente; por lo que se requieren paquetes tecnológicos que permitan la mitigación de estos impactos sin afectar la producción. Este estudio se centró en evaluar el potencial de *B.subtilis* EA-CB0575 a nivel genómico, bioquímico e *in planta*, para promover el crecimiento vegetal; su colonización rizosférica en los cultivos de interés, capacidad de producción de lipopéptidos (LPs) en la raíz y el efecto de la aplicación del microorganismo en la microbiota nativa de la planta de banano. Se determinó que esta cepa puede promover el crecimiento de plantas de banano (*Musa AAA*) variedad Williams y tomate (*Lycopersicum esculentum*) variedad Chonto, a nivel *in vitro* o en invernadero, posee genes relacionados con diferentes mecanismos de acción de las PGPR's y puede colonizar la rizósfera de los cultivos evaluados; detectándose hasta por 30 días después de la inoculación (DDI). Se encontró también que la cepa produce LPs de las familias surfactinas y fengicinas, aunque sólo se pudieron detectar surfactinas en raíces. Finalmente, se determinó que la microbiota de banano *in vitro* se compone principalmente de los géneros *Bacillus* y *Paenibacillus* en mayor proporción y de *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Methylobacterium*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, entre otros, en proporciones menores; además se determinó que cuando la cepa EA-CB0575 se aplica a las plantas de banano variedad Williams *in vitro*, se genera un efecto de enmascaramiento ó antagonismo de las poblaciones nativas de banano, posiblemente debido la dominancia de la PGPR en las raíces de la planta.

Palabras clave: *Bacillus subtilis*, colonización, promoción de crecimiento, Fluorescent *In Situ* Hybridization (FISH), Catalyzed Reporter Deposition-FISH (CARD-FISH), lipopéptidos, rizósfera.

Abstract

Crops of agricultural interest such as bananas and tomatoes are important worldwide and in order to supply the demand agrochemicals have been used for reducing the presence of diseases and maintaining their productivity. However, the extensive use of these products could generate environmental and social problems as water and air pollution, erosion and accumulation of nitrates and nitrites; for these reasons, technological packages are required for mitigating these impacts without affecting production. The objective of this study was to evaluate the potential of *B.subtilis* EA-CB0575 for plant growth promotion at genomic, biochemical and *in plant* level, its rhizosphere colonization, lipopeptide (LPs) production in roots and the effect of its application on the native microbiota of the banana plant. It was determined that this strain can promote growth in both crops, *in vitro* or in greenhouse, bacteria genome has genes related to different mechanisms of action of PGPR's and can colonize the rhizosphere of the plants, detecting up to 30 days after inoculation, in Spanish, (DDI). It was also found that the strain produces LPs of the surfactin and fengycin families, although only surfactins were detected in roots. Finally, it was determined that microbiota of banana variety Williams *in vitro* is composed mainly by the genera *Bacillus* and *Paenibacillus* and secondarily by genera as *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Methylobacterium*, *Micrococcus*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, among others. Additionally it was determined a "masking" or antagonistic effect of native banana populations when EA-CB0575 strain is applied to banana plants *in vitro*, this effect could be originated due to the dominance of the PGPR strain in plant roots.

Keywords: *Bacillus subtilis*, colonization, plant growth promotion, Fluorescent *In Situ* Hybridization (FISH), Catalyzed Reporter Deposition (CARD-FISH), lipopeptides, rizosphere.

Contenido

	<i>Pág.</i>
Contenido _____	XI
Lista de tablas _____	XIX
Introducción _____	23
Objetivos _____	26
1. <i>Bacillus subtilis</i>: microorganismo promotor de crecimiento vegetal. _____	27
1.1 Resumen _____	27
1.2 La rizósfera, un “hot-spot” de microorganismos _____	27
1.3 Bioinsumos con base en PGPR’s _____	29
1.4 Género <i>Bacillus</i>, especie <i>subtilis</i> y su papel en la agricultura _____	30
1.5 <i>B.subtilis</i> especie productora de lipopéptidos (LPs) _____	32
1.6 La colonización de la rizósfera por <i>B.subtilis</i> _____	34
1.6.1 Formación de biopelículas y colonización de la rizósfera _____	34
1.6.2 Los LPs, su relación con la formación de biopelícula y la colonización de la rizósfera _____	37
1.6.3 <i>Quorum sensing</i> y la colonización _____	38
1.6.4 La producción de exudados por la planta y su relación con la colonización de <i>B.subtilis</i> _____	40
1.7 Efecto de la aplicación de <i>B.subtilis</i> como inoculante biológico en diferentes cultivos	41
2. Potencial bioquímico y genómico de <i>B. subtilis</i> EA-CB0575 asociado a mecanismos de promoción de crecimiento vegetal _____	42

2.1 Resumen	42
2.2 Introducción	42
2.3 Metodología	45
2.3.1 Microorganismos y condiciones de cultivo	45
2.3.2 Identificación del microorganismo de estudio	46
2.3.3 Secuenciación y anotación del genoma	46
2.3.4 Identificación y caracterización de cluster génicos NRPS	48
2.3.5 Genómica comparativa de <i>B.subtilis</i> EA-CB0575 y estudio filogenético	48
2.3.6 Caracterización fenotípica de <i>B.subtilis</i> EA-CB0575	50
2.3.7 Evaluación de capacidad promotora de crecimiento de <i>B.subtilis</i> EA-CB0575 en tomate.	53
2.3.8 Análisis estadístico	54
2.4 Resultados	54
2.4.1 El genoma <i>B.subtilis</i> EA-CB0575 posee genes que codifican la producción de compuestos implicados en mecanismos PGPR's.	54
2.4.2 <i>B.subtilis</i> EA-CB0575 posee en su genoma las regiones codificantes para la producción de NRPS's de LPs.	58
2.4.3 La cepa <i>B.subtilis</i> EA-CB0575 posee un 3,9% de su genoma dedicado a la producción de metabolitos secundarios	63
2.4.4 <i>B.subtilis</i> EA-CB0575 pertenece al clado de <i>B.subtilis</i> subs. <i>subtilis</i>	64
2.4.5 Producción de índoles, sideróforos, LPs, capacidad de solubilización de fosfatos y fijación de nitrógeno: características PGPR de <i>B.subtilis</i> EA-CB0575	65
2.4.6 La especie <i>B.subtilis</i> es potencial PGPR en plantas de tomate	69
2.5 Discusión	70
2.6 Conclusión	72
3. Promoción de crecimiento en banano y tomate por la aplicación de <i>Bacillus subtilis</i> EA-CB0575.	74
3.1 Resumen	74
3.2 Introducción	74
3.3 Materiales y métodos	76
3.3.1 Microorganismo y condiciones de cultivo	76
3.3.2 Material vegetal y condiciones de cultivo	77

3.3.3	Sustratos empleados	78
3.3.4	Evaluación de promoción de crecimiento de <i>B.subtilis</i> EA-CB0575 en tomate	78
3.3.5	Evaluación de promoción de crecimiento de <i>B.subtilis</i> EA-CB0575 en banano.	80
3.3.6	Análisis estadístico	82
3.4	Resultados	82
3.4.1	<i>B. subtilis</i> EA-CB0575 promueve el crecimiento de plantas de tomate a nivel de invernadero e <i>in vitro</i>	82
3.4.2	<i>B.subtilis</i> EA-CB0575 promueve el crecimiento de banano y puede emplearse desde etapa <i>in vitro</i> para mejorar el crecimiento en invernadero	85
3.5	Discusión	89
3.6	Conclusión	92
4.	<i>Bacillus subtilis</i> EA-CB0575: capacidad de colonización en la rizósfera de cultivos de interés agrícola.	93
4.1	Resumen	93
4.2	Introducción	93
4.3	Metodología	96
4.3.1	Diseño de una sonda específica para detección de <i>B.subtilis</i>	96
4.3.2	Microorganismos y condiciones de cultivo	97
4.3.3	Sondas para FISH	99
4.3.4	Preparación y fijación de las muestras de cultivos puros	99
4.3.5	FISH de muestras de raíces provenientes de cultivos de tomate y banano a nivel <i>in vitro</i> o en suelo	99
4.3.6	Hibridación de fluorescencia <i>in situ</i> (FISH)	101
4.3.7	CARD-FISH (Catalyzed Reporter Deposition)	101
4.3.8	Visualización de las muestras	102
4.3.9	Evaluación de crecimiento e hibridación de <i>B.subtilis</i> EA-CB0575 en cultivos puros y raíces de banano y tomate en el tiempo	103
4.3.10	Visualización de muestras por SEM (Scanning Electronic Microscopy)	104
4.3.11	Evaluación de poblaciones totales recuperadas de las raíces en el tiempo	105
4.4	Resultados	105
4.4.1	Bs575 es una sonda de FISH específica para la especie <i>B. subtilis</i>	105

4.4.2 <i>B.subtilis</i> EA-CB0575 coloniza la raíz de plántulas de tomate	109
4.4.3 <i>B.subtilis</i> EA-CB0575 coloniza las raíces de banano	116
4.5 Discusión	124
4.6 Conclusión	127
5. Evaluación de la producción de LPs en las raíces de banano inoculadas con <i>B. subtilis</i> EA-CB0575 y capacidad de formación de biopelícula del microorganismo.	128
5.1 Resumen	128
5.2 Introducción	128
5.3 Metodología	131
5.3.1 Evaluación de la producción de LPs en las raíces de banano <i>in vitro</i>	131
5.3.2 Espectrometría de masas de alta resolución	132
5.3.3 Evaluación de la capacidad de formación de biopelícula de <i>B. subtilis</i> EA-CB0575 a nivel <i>in vitro</i>	132
5.3.4 Análisis estadístico	134
5.4 Resultados	135
5.4.1 Las surfactinas fueron detectadas en las raíces de banano <i>in vitro</i>	135
5.4.2 <i>B. subtilis</i> EA-CB0575 tiene la capacidad de producir biopelícula en MSgg <i>in vitro</i> y la adición de polisacáridos y exudados de la planta hace mas gruesa esta matriz multicelular.	138
5.5 Discusión	142
5.6 Conclusión	144
6. Efecto de <i>B. subtilis</i> EA-CB0575 sobre la microbiota cultivable asociada a plantas de banano	145
6.1 Resumen	145
6.2 Introducción	145
6.3 Metodología	148
6.3.1 Aislamiento de microorganismos endófitos	148
6.3.2. Extracción de DNA e identificación de aislados	149
6.3.3 Análisis de diversidad de la microbiota de banano	150

6.3.4 Efecto de la aplicación de <i>B. subtilis</i> EA-CB0575 sobre la microbiota nativa de banano variedad Williams a nivel <i>in vitro</i>	150
6.4 Resultados	151
6.4.1 El género <i>Bacillus</i> es el principal componente de la microbiota nativa de banano <i>Musa</i> AAA variedad Williams, <i>in vitro</i>	151
6.4.2 La aplicación del microorganismo <i>B. subtilis</i> EA-CB0575 en las raíces de las plantas de banano <i>in vitro</i> enmascara las poblaciones nativas presentes.	159
6.5 Discusión	163
6.6 Conclusiones	166
7. Conclusiones y Recomendaciones	167
7.1 Conclusiones	167
7.2 Recomendaciones	169
7.3 Producción bibliográfica	170
Anexos	171
Anexo I. Scripts empleados en extracción de genes codificantes de proteínas y para convertir alineamientos de formato FASTA a formato Phylip	171
Anexo II. Tablas de iones precursores para surfactinas y fengicinas A y B.	173
Anexo III. Árbol filogenético de 31 cepas de <i>Bacillus</i> sp. evaluadas en este proyecto, empleando el gen 16S rRNA.	177
Anexo IV. Análisis de suelos empleados en el estudio	178
Anexo V. Evaluación de <i>B. subtilis</i> EA-CB0575 en plantas de tomate y banano.	179
Anexo VI. FISH para células vegetativas y esporas de <i>B. subtilis</i> EA-CB0575 con la sonda /56-FAM/Bs575.	180
Anexo VII. Cinética de fluorescencia y detección de <i>B. subtilis</i> EA-CB0575 en medios TSB y SBM	181
Anexo VIII. Perfiles cromatográficos de fracción SPE 100% Metanol de <i>B. subtilis</i> EA-CB0575 cultivado en medio TSB y SBM.	181
Anexo IX. Iones precursores de surfactinas detectados en los extractos metanólicos de las muestras de raíces de banano inoculadas y sin inocular con <i>B. subtilis</i> EA-CB0575 y sembradas en MS _(s) y MS _(l)	182
Anexo X. Morfologías de endófitos aislados de raíces de banano <i>in vitro</i> en medio MS _(s)	186
Bibliografía	187

Lista de figuras

	Pág.
<i>Figura 1-1. Esquema simplificado de la ruta regulatoria que controla la formación de biopelícula en B.subtilis (Vlamakis et al., 2013).</i>	36
<i>Figura 1-2. Señalización para producción de surfactina y biopelícula (Bloom-Ackermann et al., 2016).</i>	38
<i>Figura 1-3. Quorum Sensing de B.subtilis para la competencia ó el proceso de esporulación</i>	39
<i>Figura 2-1. Diagrama de la distribución del genoma completo de B.subtilis EA-CB0575.</i>	55
<i>Figura 2-2. Predicción del metabolismo de triptófano y sus derivados por medio de RAST para B.subtilis EA-CB0575.</i>	59
<i>Figura 2-3. Predicción del metabolismo de sideróforos y sus derivados por medio de RAST para B.subtilis EA-CB0575 y la cepa tipo.</i>	60
<i>Figura 2-4. Predicción del metabolismo de compuestos volátiles 2,3 butanodiol y la acetoína y sus derivados por medio de RAST para B.subtilis EA-CB0575 y para la cepa tiop.</i>	61
<i>Figura 2-5. Determinación de los loci para la producción de las NRPS's de surfactinas, fengicinas e iturinas en los genomas de B. amyloliquefaciens FZB42, B. subtilis EA-CB0575 y B. subtilis 168.</i>	62
<i>Figura 2-6. Filogenia de Bacillus spp. a partir de genes housekeeping (rpoB, gyrA, purH, polC y groEL) obtenida por los métodos de inferencia bayesiana y máxima verosimilitud.</i>	64
<i>Figura 2-7. Cromatograma de HPLC para extracto SPE-100% metanol del cultivo de B.subtilis EA-CB0575 en medio MOLP.</i>	66
<i>Figura 2-8. Espectros MS y MS/MS de las surfactinas producidas por B. subtilis EA-CB0575 en medio MOLP</i>	67
<i>Figura 2-9. Espectros MS y MS/MS de las fengicinas producidas por B.subtilis EA-CB0575 en medio MOLP</i>	68
<i>Figura 2-10. Efecto de la aplicación de B. subtilis EA-CB0575 y cepas de referencia en la promoción de crecimiento de tomate a nivel de invernadero en sustrato comercial.</i>	69
<i>Figura 3-1. Proceso de evaluación de plantas de banano desde nivel in vitro hasta final de la etapa de invernadero</i>	81

<i>Figura 3-2. Efecto de diferentes concentraciones de esporas y células vegetativas de B. subtilis EA-CB0575 en el crecimiento de plantas de tomate en sustratos con A) alto contenido de materia orgánica después de 60 DDI y B) bajo contenido de materia orgánica después de 30 DDI.</i>	83
<i>Figura 3-3. Efecto de diferentes concentraciones de esporas y células vegetativas de B.subtilis EA-CB0575 en A) la germinación e índice de vigor de las semillas de tomate y B) en la promoción de crecimiento de tomate a nivel in vitro en medio MS_(s) 30 DDI.</i>	84
<i>Figura 3-4. Efecto de diferentes concentraciones de esporas y células vegetativas de B.subtilis EA-CB0575 en el crecimiento de plantas de tomate en medio MS_(L).</i>	85
<i>Figura 3-5. Efecto de diferentes concentraciones de esporas y células vegetativas de B.subtilis EA-CB0575 en el crecimiento de plantas de banano en sustrato comercial a nivel de invernadero a los 120 DDI.</i>	86
<i>Figura 3-6. Efecto de la aplicación de B.subtilis EA-CB0575 en forma de esporas o células vegetativas a 1×10^8 UFC/mL en el crecimiento de las plantas de banano en medio MS_(L).</i>	87
<i>Figura 3-7. Efecto de la aplicación de esporas o células vegetativas de B. subtilis EA-CB0575 en la promoción de crecimiento de plantas de banano inoculadas desde etapa in vitro en MS_(s) hasta etapa de invernadero.</i>	88
<i>Figura 3-8. Efecto de la aplicación de esporas o células vegetativas de B. subtilis EA-CB0575 en la promoción de crecimiento de plantas de banano inoculadas desde etapa in vitro en MS_(L) hasta etapa de invernadero.</i>	89
<i>Figura 4-1. Sección del gen 16s rRNA de B.subtilis donde se reportan diferencias entre las secuencias de B. amyloliquefaciens y B.subtilis (Reva et al., 2004).</i>	97
<i>Figura 4-2. Hibridación de la sonda /56-FAM/-Bs575 con diferentes especies del género Bacillus y grupos filogenéticamente distantes.</i>	107
<i>Figura 4-3. Detección de B.subtilis EA-CB0575 en raíces de tomate por FISH entre 0-30 DDI.</i>	110
<i>Figura 4-4. Detección de B.subtilis EA-CB0575 en raíces de tomate entre 0 y 30 DDI por CARD-FISH</i>	111
<i>Figura 4-5. Colonización de B.subtilis EA-CB0575 en la raíz principal de plántulas de tomate en diferentes sustratos de crecimiento a los 15 DDI.</i>	113
<i>Figura 4-6. Patrones de colonización de B.subtilis EA-CB0575 en raíces de tomate en medio MS_(s) a los 15 DDI.</i>	114
<i>Figura 4-7. Microscopía electrónica de barrido de raíces de tomate con aplicación del B.subtilis EA-CB0575 a los 30 DDI.</i>	115
<i>Figura 4-8. Detección de B.subtilis EA-CB0575 en raíces de banano por FISH entre 0 y 30 DDI.</i>	117
<i>Figura 4-9. Tamaño de la población microbiana de colonias similares a B. subtilis EA-CB0575 presentes en las raíces de banano en medio MS_(s) entre 0 y 30 DDI.</i>	118
<i>Figura 4-10. Detección de B.subtilis EA-CB0575 en raíces de banano por CARD-FISH (entre 0 y 30 DDI).</i>	119

Figura 4-11. Colonización de <i>B.subtilis</i> EA-CB0575 en raíces principales de banano en diferentes sustratos de crecimiento a los 15 DDI. _____	120
Figura 4-12. Patrones de colonización de <i>B.subtilis</i> EA-CB0575 en las raíces de banano en medio $MS_{(s)}$ a los 15 DDI. _____	121
Figura 4-13 SEM de raíces de plántulas de banano con y sin aplicación de <i>B.subtilis</i> EA-CB0575 a 30 DDI. _____	122
Figura 4-14. Micrografías por CLM para las raíces de banano con aplicación de <i>B.subtilis</i> EA-CB0575 _____	123
Figura 5-1. Espectros MS y MS/MS del tratamiento aplicación de células vegetativas de <i>subtilis</i> EA-CB0575 en raíces de plantas de banano en medio $MS_{(L)}$. _____	138
Figura 5-2. Producción de biopelícula de <i>B. subtilis</i> NCTC 3610, EA-CB0575 y 168 en medio MS_{Gg} y $MS_{(L)}$ _____	139
Figura 5-3. Efecto de la aplicación de exudados de la planta de banano o extractos de raíz sobre formación de biopelícula de <i>B. subtilis</i> EA-CB0575 en medio MS_{Gg} _____	140
Figura 5-4. Efecto de la aplicación de exudados de la planta de banano o extractos de raíz sobre formación de biopelícula de <i>B. subtilis</i> EA-CB0575 en medio $MS_{(L)}$. _____	141
Figura 6-1. Tamaño de la población microbiana endófito de las raíces de plantas de banano variedad Williams a nivel <i>in vitro</i> . _____	152
Figura 6-2. Abundancia relativa de microorganismos endófitos que componen la microbiota endófito nativa de las raíces de plantas de banano cultivadas a nivel <i>in vitro</i> . _____	156
Figura 6-3. Análisis de rarefacción, PCoA's y curvas de perfil para la diversidad microbiana endófito de los lotes de banano Williams cultivados a nivel <i>in vitro</i> . _____	158
Figura 6-4. Abundancia relativa de microorganismos que componen la microbiota nativa de plantas de banano cultivadas a nivel <i>in vitro</i> _____	160
Figura 6-5. Análisis de rarefacción, PCoA y curvas de perfil para la diversidad endófito de los tratamientos con y sin aplicación del microorganismo <i>B. subtilis</i> EA-CB0575. _____	162

Lista de tablas

	Pág.
<i>Tabla 2-1. Microorganismos empleados en el análisis filogenético</i> _____	50
<i>Tabla 2-2. Anotación de genes implicados en el metabolismo y otros procesos celulares de B.subtilis EA-CB0575 y cepa referencia B.subtilis 168.</i> _____	56
<i>Tabla 2-3. Genómica comparativa de B.subtilis EA-CB0575 con las cepas de referencia.</i> _____	63
<i>Tabla 2-4. Rasgos bioquímicos PGPR a nivel in vitro de diferentes cepas de Bacillus EA-CB0575 y otras cepas de referencia de Bacillus sp.</i> _____	65
<i>Tabla 4-1. Cepas empleadas en este estudio</i> _____	98
<i>Tabla 5-1. Iones precursores detectados por medio de espectrometría de masas en tratamientos con y sin aplicación de B. subtilis EA-CB0575 en raíces de banano in vitro</i> _____	136
<i>Tabla 6-1. Aislados endófitos de los diferentes lotes de banano variedad Williams y sus identidades de acuerdo a la secuenciación del gen 16S rRNA.</i> _____	152
<i>Tabla 6-2. Análisis de diversidad microbiana α y β para los lotes de plantas de banano cultivadas a nivel in vitro</i> _____	157
<i>Tabla 6-4. Análisis de diversidad α y β para los tratamientos con y sin aplicación de B. subtilis EA-CB0575</i> _____	161

Abreviaturas

Abreviatura	Término
16S rDNA	sección 16S del ADN ribosomal (subunidad pequeña)
16S rRNA	sección 16S del ARN ribosomal (subunidad pequeña)
ADE	Agua destilada estéril
AIA	Ácido indol acético
ANOVA	"Analysis of Variance" (análisis de varianza)
BLAST	"Basic Local Alignment Search Tool"
CARD-FISH	"Catalized reporter deposition Fluorescent <i>in situ</i> Hybridization" (Hibridación fluorescente <i>in situ</i> con deposición del reportero catalizado)
CAS	Cromo-azurol-S
DANE	Departamento administrativo Nacional de Estadística
DCA	Diseño completamente aleatorio
DNA	Desoxiribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico)
dNTPs	deoxynucleotides triphosphates (trifosfatos de desoxinucleótidos)
DPL	Diámetro de la planta
EPS	Exopolisacárido
ESI	"Electro-Spray Ionization" (Ionización por Electrospray)
FAO	"Food and Agriculture Organization of the United Nations" (Organización de alimentos y agricultura de las Naciones Unidas)
FISH	Fluorescent <i>in situ</i> hybridization (Hibridación de fluorescencia <i>in situ</i>)
HCN	Ácido cianhídrico

HPLC	"High Performance Liquid Chromatography" (Cromatografía líquida de alta resolución)
IB	Inferencia Bayesiana
ISR	"Induced Systemic Resistance" (Resistencia sistémica inducida)
Kin A	Kinasa A
k-mer	secuencia de reads de longitud k
Kpa	Kilo-Pascales
Kpb	Kilo pares de bases
LA	Longitud aérea
LPs	Lipopéptidos
LR	Longitud radical
LSD	"Least Significance Difference" (Diferencia mínima significativa)
MALDI-TOF-MS	"Matrix-Assited Laser Desortion/Ionization Time of Fight Mass Spectrometry" (Espectrometría de masas con desorción- ionización láser de matriz asistida con análisis de tiempo de vuelo)
MAMPs	"Microbe Associated Molecular Patterns" (Patrones moleculares asociados a microorganismos)
Mb	Megabytes
MCMC	Markov Chain Monte Carlo
MeOH	Metanol
ML	Maxima verosimilitud
MOLP	"Medium Optimal for Lipopéptide Production"
MS	Espectrometría de Masas
MW	"Molecular Weight" (Peso molecular)
NBRIP	"National Botanical Research Institute's phosphate growth medium"
ND	No Determinado
NGS	"New Generation Sequencing" (Secuenciación de nueva generación)
NH	Número de hojas

NRPS	"Non-ribosomal proteins Synthases" (Sintasas de péptidos no ribosomales)
Nt	Nucleótidos
ORF	"Open Reading Frame" (Marco abierto de lectura)
Pb	pares de bases
PCR	"Polymerase Chain Reaction" (reacción en cadena de la polimerasa)
PCR-DGGE	Reacción en cadena de la polimerasa con gel de electroforesis en gradiente desnaturalizante
PFA	Peso fresco aéreo
PFR	Peso fresco radical
PFT	Peso fresco total
PGPR	"Plant growth promoting rhizobacteria" (Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal)
PPL	Perímetro de la planta
PSA	Peso seco aéreo
PSR	Peso seco radicular
PST	Peso seco total
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa-cuantitativa
QS	"Quorum Sensing"
rDNA	ADN ribosomal
ROS	"Reactive oxygen species" Especies reactivas de oxígeno
Rpm	Revoluciones por minuto
rRNA	ARN ribosomal
SLC	Sobrenadantes Libres de Células
SPE	"Solid Phase Extraction" Extracción en fase sólida
TFA	"Trifluoroacetic Acid" Ácido trifluoroacético
T-RFLP	"Terminal restriction fragment length polymorphisms"
TSA	Tryptic Soy Agar" Agar tripticasa de soya
TSB	"Tryptic Soy Broth" Caldo tripticasa de soya
UFC	Unidades formadoras de colonia

Introducción

En la actualidad la tierra arable y la capacidad de producción mundial de alimentos han comenzado a ser insuficientes para satisfacer la demanda de la creciente población. Se prevé que esta situación se acentuará con los años alcanzando índices de 0,16 hectáreas arables por persona en 2025, con una reducción de 36% respecto al año 2000 (Borriss, 2011). Por esto, deben tomarse medidas para alcanzar una producción sostenible de alimentos para la población mundial, la cual se estima en 9,2 mil millones de personas para 2050 (FAO, 2009). El crecimiento de la demanda alimentaria ha activado el uso desmedido de agroquímicos para explotar la capacidad de producción del suelo, creando problemas como la acidificación, polución de las aguas, contaminación del aire y potenciando enfermedades relacionadas con la presencia de nitritos y nitratos en las fuentes de alimento humano y animal (Prashar & Shah, 2016).

Desde 1904 cuando Lorentz Hiltzner descubrió la diversidad de microorganismos presentes en la capa de suelo aledaña a las raíces de las plantas, a la que llamó rizósfera, comenzaron estudios para dilucidar el efecto de estos microorganismos en el desarrollo vegetal (Bhattacharyya & Jha, 2012), pero sólo hasta 1978 cuando Kloepper y Schroth comprobaron el potencial de algunos microorganismos de la rizósfera para promover el crecimiento en la planta, se entendió el papel que los microorganismos del suelo pueden protagonizar en la agricultura. Las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR's: Plant Growth Promoting Rhizobacterias) son microorganismos que colonizan de forma competitiva las raíces de las plantas, estimulan su crecimiento y/o reducen la incidencia de enfermedades (Haas & Defago, 2005). Ellas deben ser capaces de colonizar la raíz, sobrevivir, multiplicarse y promover el desarrollo de la planta, contribuyendo a los sistemas de agricultura sostenible (Barea et al., 2005). Son diversas las investigaciones para evaluar el efecto de estos microorganismos en cultivos perennes (Aslantaş et al., 2007; Domenech et al., 2004) o en temporales (Govindasamy et al., 2015; Grobelak et al., 2015), aumentando el crecimiento y la productividad de los cultivos (El-Howeity & Asfour, 2012;

O'Callaghan, 2016) y abriendo paso al desarrollo de inoculantes biológicos (Calvo et al., 2014).

En Colombia la actividad agrícola es uno de los ejes de la economía. El banano (*Musa AAA*), uno de los cultivos estudiados en este trabajo, es importante para la economía del país debido a que es el tercer producto de exportación y se cultiva en 47.407 hectáreas a nivel nacional, alcanzando exportaciones por US \$836.639 millones (AUGURA, 2016). Sin embargo, el sector bananero enfrenta problemas de productividad y sanidad de los suelos por el uso extensivo de agroquímicos, y patologías como la Sigatoka negra (causada por *Mycosphaerella fijiensis* Morelet) y el Moko (causada por *Ralstonia solanacearum*) son amenazas constantes para el cultivo en las zonas productoras de Urabá, Santa Marta, Eje Cafetero y la Guajira. Además, la posible entrada de una nueva enfermedad, el Mal de Panamá (agente causal *Fusarium oxysporium* f. sp. cubense raza 4), amenaza con destruir los cultivos de las variedades comerciales en el país. El tomate (*Lycopersicon esculentum*), otro de los ejes temáticos de la presente investigación, es un cultivo de consumo interno con cerca de 14.855 hectáreas de producción y con gran dinámica en la gastronomía y desarrollo nacional (FINAGRO, 2014). Con problemas serios de contaminación en los suelos, este cultivo debe tratarse con agroquímicos debido a sus requerimientos nutricionales y al ataque de patologías como el tizón tardío (*Phytophthora infestans*), oídio (*Leveillula taurica*) y la cladosporiosis (*Fulvia fulva*) (Jaramillo et al., 2007). Ambos cultivos requieren paquetes tecnológicos para mitigar los daños causados por el monocultivo y las actividades del agro, proporcionando opciones para la sostenibilidad y para la apertura de nuevos mercados.

El uso de las PGPR's en estos cultivos podría ser una alternativa para la solución de las problemáticas asociadas a los impactos negativos de agroquímicos en la agricultura, además de mejorar el crecimiento y desarrollo de las plantas. Durante décadas, los estudios de promoción de crecimiento con PGPR's se han centrado en el aislamiento y evaluación de características bioquímicas de los aislados, con el fin de tener bancos de cepas promisorias para el desarrollo de productos biofertilizantes o bioestimulantes (Bashan, 1998; Dinesh et al., 2015). Sin embargo, la evaluación de su colonización en la rizósfera ha sido poco reportada, a pesar de que es una característica que se ha relacionado positivamente con la promoción de crecimiento en los cultivos (Compant et al., 2010; Figueroa-López et al., 2016). En algunas evaluaciones, se han aplicado los microorganismos en diferentes especies vegetales y se ha intentado detectar y monitorear

su presencia en la rizósfera y la raíz por métodos clásicos. Sin embargo, esto permite determinar la existencia de morfologías similares a la inoculada, mas no es posible asegurar que los microorganismos recuperados son los mismos aplicados (Moter & Gobel, 2000). Debido a lo anterior, diversos investigadores plantean el uso de técnicas como la inserción de genes de fluorescencia para el monitoreo del microorganismo con luz fluorescente (Bacilio et al., 2004; Fan et al., 2012a), la microscopía electrónica de barrido (ChinAwoeng et al., 1997; Liu et al., 2006) o los métodos de hibridación *in situ*, como es el caso de FISH (Fluorescent *in situ* hybridization) y sus derivados (de-Bashan et al., 2010; López et al., 2011).

En esta Tesis Doctoral se evaluó el efecto promotor de crecimiento de *B.subtilis* EA-CB0575 sobre plantas de banano variedad Williams y plantas de tomate variedad Chonto-Santa Cruz con inoculaciones tempranas del microorganismo, a nivel *in vitro* en medio MS, y a nivel de invernadero en suelo. Se realizó el ensamble y análisis del genoma del microorganismo, con el fin de conocer la presencia de genes que intervienen en la promoción de crecimiento vegetal, y se evaluó la colonización del microorganismo en la rizósfera de las dos especies vegetales de interés, empleando los métodos FISH y CARD-FISH (Catalyzed Reporter Deposition- FISH). Además se realizó un estudio de producción de compuestos tipo lipopéptidos (LPs), específicamente la surfactina y la fengicina, en las raíces de las plantas evaluadas; para relacionar la producción de estos compuestos con la colonización del microorganismo en la raíz. Finalmente, se evaluó la microbiota nativa presente en el cultivo de banano *in vitro* en plantas inoculadas y sin inocular con *Bacillus*, con el fin de analizar el efecto de la aplicación del microorganismo de estudio sobre las poblaciones nativas de la planta.

Objetivos

General

Determinar la capacidad promotora de crecimiento de *Bacillus subtilis* EA-CB0575, su colonización rizosférica en diferentes cultivos agrícolas y potencial genómico y bioquímico.

Específicos

- Determinar el potencial genómico y bioquímico de *Bacillus subtilis* EA-CB0575 con relación a los mecanismos de promoción de crecimiento vegetal.
- Evaluar el efecto de la inoculación de *Bacillus subtilis* EA-CB0575 en la promoción de crecimiento de cultivos de interés agrícola.
- Determinar la capacidad de *Bacillus subtilis* EA-CB0575 para colonizar la rizósfera de cultivos de interés agrícola
- Evaluar la capacidad de *Bacillus subtilis* EA-CB0575 para producir lipopéptidos en las raíces de los cultivos de interés agrícola a nivel *in vitro*.
- Evaluar el efecto de la inoculación de *Bacillus subtilis* EA-CB0575 sobre la microbiota nativa de uno de los cultivos de interés agrícola.

1. *Bacillus subtilis*: microorganismo promotor de crecimiento vegetal.

1.1 Resumen

La agricultura del siglo XXI debe enfrentar cambios que permitan una producción sostenible para suministrar alimentos a la población humana sin impactar negativamente los ecosistemas. Los métodos convencionales de producción generan problemas ambientales y de salud pública, y una alternativa a esta problemática es el uso de métodos biológicos como la aplicación de PGPR's. Estos microorganismos mejoran el crecimiento y desarrollo de los cultivos impactando el ambiente en menor grado respecto a los agroquímicos convencionales. La bacteria *Bacillus subtilis* incluye cepas con este potencial, que pueden ser útiles en la agricultura y emplearse como principio activo de bioinoculantes; siendo los cultivos de importancia económica, como el banano y el tomate, un campo interesante de aplicación. Estos cultivos son muy demandantes de fertilizantes, y la aplicación de bioinoculantes es una alternativa a la reducción de agroquímicos y al mejoramiento del crecimiento vegetal. En esta revisión, se explora el papel de la rizósfera en la agricultura, el potencial de *B.subtilis* como promotor de crecimiento vegetal y sus generalidades como especie, se reporta el papel de los lipopéptidos (LPs), la formación de biopelícula y el *Quorum Sensing* (QS) en la colonización de *B.subtilis* en la rizósfera, y se enuncian los efectos que la aplicación de bioinoculantes puede generar sobre las poblaciones microbianas de cultivos de interés comercial; todo esto con el fin de brindar elementos para la comprensión de la interacción planta-PGPR's.

1.2 La rizósfera, un “hot-spot” de microorganismos

El suelo es uno de los ecosistemas más ricos en la Tierra y su complejidad está determinada por interacciones físicas, químicas y biológicas las cuales se modulan por las condiciones del ambiente (Barea et al., 2005). Es un medio heterogéneo gobernado por gradientes de nutrientes y energía debido a la presencia de las raíces de las plantas, las cuales producen exudados que atraen diversas especies; generando cambios en las concentraciones de O₂, CO₂, H₂O y en el pH del sistema (Knudsen & Dandurand, 2007). Numerosos estudios han

demostrado que los microorganismos del suelo interactúan con las raíces de las plantas y el sustrato con el fin de formar una interfase suelo-raíz (Kozyrovska et al., 1996; Lucy et al., 2004), produciendo diferentes zonas de actividad microbiana denominadas: suelo, raíz, rizoplasma y rizósfera. El suelo comprende el sustrato alejado de la planta, la raíz es la parte de la planta que se encuentra en el suelo con presencia de microorganismos endófitos y epífitos capaces de colonizar los tejidos externos e internos (Hallmann & Berg, 2006), el rizoplasma comprende la superficie de la raíz, las partículas de suelo adheridas a ella y microorganismos anclados por medio de flagelos, fimbrias o polisacáridos superficiales (Mwajita et al., 2013); y finalmente está la rizósfera, zona aledaña a la raíz, fuertemente influenciada por la presencia de exudados radiculares, con gran cantidad de microorganismos que aprovechan los nutrientes para su desarrollo. Esta rizósfera es la zona en la que se centra este trabajo debido a que es allí donde se presenta un “hot spot” microbiano debido a los rizodepositos nutricionales y a la alta actividad metabólica presente (Mwajita et al., 2013; Raaijmakers et al., 2009). Es complejo definir donde empieza la rizósfera y donde comienza el rizoplasma, por lo que ambas zonas se definen como un espacio continuo de interacción planta-microorganismos.

Las bacterias que habitan la rizósfera y el rizoplasma pueden ejercer efectos positivos, neutros o deletéreos sobre el crecimiento y desarrollo de la planta. Los que ejercen un efecto positivo y que tienen la capacidad de colonizar competitivamente las raíces se denominan PGPR's (Plant Growth Promoting Rhizobacterias), según la definición de Kloepper & Schroth, 1978. Este concepto se ha delimitado para las bacterias que poseen al menos dos de estas tres características: colonización agresiva de las raíces, estimulación del desarrollo de la planta y/o biocontrol. Existen dos tipos de PGPR's: las ePGPR (PGPR extracelulares), entre ellas microorganismos de los géneros *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Serratia*, entre otros, que se encuentran en la rizósfera, en el rizoplasma, o en los espacios entre las células de la corteza radical; y su principal característica es que están en vida libre; y las iPGPR (PGPR intracelulares), las cuales se encuentran dentro de nódulos en la raíz y a las que pertenecen géneros como *Frankia* y la familia de las Rhizobiaceae (Bhattacharyya & Jha, 2012).

Los mecanismos de acción de estos microorganismos para mejorar el crecimiento y sanidad de los cultivos se concentran en dos grupos. El primero son los mecanismos directos de promoción, es decir, aquellos que estimulan la nutrición de la planta directamente, como la

producción de fitohormonas, la solubilización de minerales no disponibles en el suelo como fosfatos y hierro y la fijación de nitrógeno atmosférico. El segundo grupo se compone de los mecanismos de estimulación indirecta del crecimiento debido a la supresión de patógenos, como la producción de antibióticos, la producción de enzimas líticas que atacan patógenos, la inducción de resistencia sistémica (ISR), la protección contra estrés biótico y abiótico y la competencia por nichos en la rizósfera (Grobela et al., 2015). Adicionalmente, existen un grupo de mecanismos que pueden ser tanto directos como indirectos, como la producción de compuestos volátiles y de sideróforos; los cuales modulan el crecimiento de la planta pero también tienen efecto de biocontrol (Beneduzi et al., 2012).

1.3 Bioinsumos con base en PGPR's

El creciente interés de los consumidores por productos naturales y/o orgánicos ha despertado un afán de diversos sectores de la economía para ofertar productos sostenibles, generando en el sector agrícola lo que se ha denominado "agricultura verde" y movilizándolo a empresas de agroquímicos a la producción de opciones alternativas a los fertilizantes y pesticidas convencionales (Singh et al., 2011). Fruto de esto se han generado inoculantes biológicos, que de acuerdo a su forma de acción se han clasificado en tres grupos: biofertilizantes, biopesticidas y bioestimulantes o fitoestimulantes (Chojnacka, 2015). Los biofertilizantes son aquellos productos con base en microorganismos con capacidad de promover el crecimiento vegetal debido a un aumento en la disponibilidad y toma de nutrientes por la planta. Los mecanismos de acción por los que las PGPR's de estos productos actúan son básicamente la fijación biológica de nitrógeno y la solubilización de fosfatos (Vessey, 2003). Los biopesticidas están basados en microorganismos biocontroladores de enfermedades y su principio de acción es la producción de antibióticos, sideróforos, HCN, enzimas líticas o la generación de resistencia sistémica o adquirida para la planta (Deravel et al., 2014). Finalmente, los bioestimulantes ó fitoestimuladores son basados en microorganismos productores de fitohormonas que liberan estos compuestos en la rizosfera y pueden ser adsorbidos por la planta, generando mayor crecimiento (Calvo et al., 2014). Algunos de estos productos son comercializados actualmente bajo las siguientes denominaciones: Sonata® y Serenade® (Bayer Crop Science), Superzyme® biological growth factor 1-0-4 (Arbico Organics, USA), Bioshield-R® (Biostar, México), Biostart™ Rhizoboost (Bio-Cat Microbials, USA), HiStick® (Helena Chemicals, USA), Kodiak®, BioYield® y Yieldshield® (Gustafson LLC, USA), RhizoVital® (AgrichemBio,

España), Rhizoplus® (ABiTEP GmbH, Alemania), RhizoPlex® (Novozymes, Dinamarca), la mayoría usan *Bacillus* sp. como principio activo y se han empleado en diversos cultivos, generalmente de ciclo corto (Borriss, 2011). En comparación con los agroquímicos, los productos con PGPR's tienen varias ventajas: se consideran más seguros, presentan un daño ambiental reducido, un mínimo riesgo en la salud humana, actividad más dirigida, son efectivos en pequeñas cantidades, ellos mismos se reproducen pero son controlados por las interacciones con las poblaciones nativas y la planta, se degradan más rápidamente que los químicos, no desarrollan resistencia a patógenos debido a sus múltiples mecanismos de acción; y pueden emplearse en sistemas de manejo de cultivos convencionales o integrados (Berg, 2009). Sin embargo, entre sus desventajas se encuentran la sensibilidad de algunos de los microorganismos a las condiciones ambientales, su corto ciclo de vida en el suelo respecto a los productos convencionales y su eficacia inconsistente en condiciones de laboratorio, invernadero y campo. No obstante, la creciente investigación en el área brinda el conocimiento de los factores que afectan el funcionamiento de estos microorganismos con el fin de alcanzar la reproducibilidad en los ensayos (Labuschagne et al., 2011).

El mercado de inoculantes biológicos se ha valorado en los últimos años alrededor de USD \$440 millones, con una estimación de crecimiento anual cercana al 10%, y con proyecciones de USD \$1295 millones para el 2020. Asia es el continente de mayor demanda, debido a las ayudas arancelarias que gobiernos como el de China e India han desarrollado para los productores agrícolas que empleen estos productos (Berg, 2009; Owen et al., 2015). Especies como *Pseudomonas fluorescens*, *B. thuringiensis* y *B. subtilis* son los agentes biológicos de mayor comercialización (Berg, 2009).

1.4 Género *Bacillus*, especie *subtilis* y su papel en la agricultura

El género *Bacillus* fue nombrado por primera vez en 1872 por Ferdinand Cohn para incluir las bacterias en forma de bastones que crecían en filamentos. En 1876, Cohn y Koch de forma independiente, determinaron que las especies reconocidas en este género hasta entonces (*B. subtilis* y *B. anthracis*) podían formar una estructura que denominaron endospora bacteriana o espora, altamente resistente al calor y que sobrevivía a condiciones extremas de hidratación, sequía, calor, luz U.V., entre otros (Hardwood, 1989). Esta

estructura se forma en condiciones de estrés, cuando la actividad metabólica alterna realizada por el microorganismo con el fin de restablecer el crecimiento celular falla, y ni la inducción de quimiostasis, la producción de hidrolasas y antibióticos y la formación de biopelícula logran que la célula vegetativa se mantenga (Kunst et al., 1997; Tan & Ramamurthi, 2014). Entonces, comienza un proceso regulado por factores de transcripción, proteínas kinasas y moléculas señal, con el fin de formar dos células a partir de una célula binucleada, la célula madre y la espora, cada una con una copia del cromosoma bacteriano. La espora puede convertirse de nuevo en una célula vegetativa por medio del proceso de germinación, el cual ocurre cuando las condiciones son aptas para el desarrollo microbiano; cuando el estrés disminuye y las células encuentran nutrientes para su crecimiento poblacional y mantenimiento (Errington, 2003).

Las bacterias del género *Bacillus* son anaerobias facultativas, bacilos Gram positivos y miembros del filum Firmicutes. Se encuentran ampliamente distribuidas en suelo, aire, agua y están involucradas en transformaciones biológicas y químicas. Se consideran fábricas microbianas de moléculas bioactivas útiles para las industrias de enzimas, antibióticos, productos bioquímicos de alta gama (incluidos sabores y suplementos alimenticios), productos insecticidas y para la agricultura (Rooney et al., 2009). Su capacidad de formar esporas hace que sean promisorias para la elaboración de productos biotecnológicos, formulando el microorganismo como principio activo en su forma esporulada y reduciendo los cuidados con las células en las diferentes etapas del proceso; a su vez, esto mejora la logística de entrega del producto al consumidor final (Ongena & Jacques, 2008; Young et al., 1995). El rol principal de este género en la naturaleza parece relacionarse a los ciclos del carbono y nitrógeno, pero algunas especies son patógenos humanos y del ganado (*B. anthracis* y *B. cereus*) ó patógenos de insectos (*B. thuringiensis*). Sin embargo, la mayoría de sus especies no son patogénicas. Este género es muy diverso, comprende bacterias móviles, no móviles, organotróficas, litotróficas y con un amplio rango de fisiologías. Se han realizado diferentes estudios taxonómicos basados en el análisis del gen 16S rRNA con el fin de determinar las especies que lo componen, dividiéndolo en clusters, en los que se encuentran el cluster de *B. subtilis* y el cluster de *B. cereus*, cada uno dividido a su vez en especies muy diversas (Rooney et al., 2009). Estos microorganismos tienen la capacidad de formar biopelículas (Mielich-Suss & Lopez, 2015), las cuales son grupos de células embebidas en una matriz compuesta de exopolisacáridos (EPs), proteínas y en algunos casos DNA; generando arquitecturas multicelulares complejas

(Beauregard et al., 2013). Cuando las células enfrentan un cultivo constante en medio líquido a nivel de laboratorio, corren el riesgo de perder esta capacidad por un proceso conocido como “domesticación” (Vlamakis et al., 2013). La cepa *B. subtilis* 168 (Burkholder & Giles, 1947) es una cepa domesticada, la cual perdió la capacidad de formación de biopelícula debido a mutaciones que se presentan en cultivos secuenciales y es la cepa de referencia para estudios en el tema, al compararse con cepas productoras de esta matriz (Zeigler et al., 2008).

B. subtilis es una especie del género *Bacillus*, la cual pertenece al cluster *B. subtilis*. Se considera un modelo en el trabajo con células Gram positivas (Kunst et al., 1997) y se encuentra principalmente en la rizósfera y raíces de plantas (Pandey & Palni, 1997). Tiene la capacidad de producir diferentes tipos de antibióticos (lantibióticos, lantibióticos inusuales, péptidos producidos no ribosomalmente y antibióticos misceláneos), y entre un 4-5% de su genoma se emplea para la producción de estos compuestos (Stein, 2005). Recientes estudios taxonómicos han revelado que esta especie puede considerarse como un complejo de especies, debido a que las secuencias de 16S rRNA comparten similitud de 99% con cepas de *B. amyloliquefaciens*, *B. atrophaeus*, *B. mojavensis*, *B. tequilensis*, *B. vallismortis*, *B. velezensis*, entre otras (Reva et al., 2004; Wang et al., 2008).

1.5 *B. subtilis* especie productora de lipopéptidos (LPs)

Los miembros del género *Bacillus* son considerados fábricas de compuestos bioactivos, muchos de ellos empleados en la defensa contra microorganismos, insectos y animales superiores, para transporte de metales, como hormonas sexuales, en la simbiosis con las plantas, ó como factores de diferenciación (Chaabouni et al., 2012; Ongena & Jacques, 2008). Dentro de estos compuestos, los LPs han logrado especial atención debido a su capacidad de actuar como agentes antimicrobianos, inmunosupresores y citotóxicos (Raaijmakers et al., 2010). Estos metabolitos están compuestos químicamente por una cola lipídica unida a un oligopéptido cíclico. Pueden ser producidos por diversos géneros bacterianos por medio de complejos de megaenzimas denominadas sintetisas de péptidos no ribosomales (NRPS's), las cuales son módulos proteicos que reconocen, activan, modifican y enlazan los aminoácidos intermedios para la producción del péptido (Roongsawang et al., 2010). Existe una gran diversidad estructural de LPs debido a las diferencias en la longitud y composición de la fracción lipídica y del número y tipo de

aminoácidos en la cadena peptídica (Raaijmakers et al., 2010). Se conoce que los LPs producidos por *B.subtilis* se distribuyen en cinco familias: iturinas, fengicinas, surfactinas, kurstakinas y locilomicinas, cada una con variantes en los péptidos presentes y/o diferencias en la longitud e isomería de las cadenas de ácidos grasos (Bechet et al., 2012; Luo et al., 2015).

Las iturinas comprenden los LPs compuestos por un heptapéptido unido a una cadena de ácido graso β -hidroxi con una longitud de 14 a 17 carbonos. Esta familia incluye las isoformas de iturina A, C, D, y E; las bacilomicinas (D, F y L) y la micosubtilina. Son compuestos altamente hemolíticos y actúan principalmente contra hongos (Besson et al., 1976; Ongena & Jacques, 2008). Las fengicinas, por su parte son decaapéptidos con un anillo lactona interno en la fracción peptídica y una cadena de β -hidroxi ácidos grados de 14 a 18 carbonos que pueden ser saturados o insaturados. Son activas contra hongos filamentosos especialmente, pero menos hemolíticas que las otras familias de LPs de *Bacillus* (Ongena & Jacques, 2008). El grupo de las surfactinas, está compuesto por heptapéptidos unidos a una cadena de ácido graso β -hidroxy de 13 a 15 carbonos y con una estructura cíclica conformada por un anillo lactona entre la región del β -hidroxi del ácido graso y el C-terminal de la parte peptídica. Dentro del grupo de las surfactinas se encuentran la esperina, lichenisina, pumilacidina y las surfactinas. Estos metabolitos presentan una alta actividad biológica, llegando a ser protagonistas en procesos de biocontrol de patógenos en la rizósfera (Bóka et al., 2016). Por su parte, las kurstakinas son una familia de cuatro heptalipopéptidos cíclicos que difieren sólo en sus cadenas de ácidos grasos, y cuya estructura es muy similar a la de otras familias de LPs. Se caracterizan por un enlace lactona interno entre el C terminal y un residuo de serina, además se diferencia de otros LPs por la presencia de un residuo histidina. Estos compuestos tienen una alta actividad antifúngica (Abderrahmani et al., 2011). La última familia, las locilomicinas, tienen una secuencia de nonapéptidos y son macrociclados, además poseen una cadena de ácidos grasos de 11-13 carbonos. Son moléculas activas contra bacterias y virus y tienen baja actividad hemolítica. La gran diferencia de esta familia de LPs con las otras es que su forma de producción no es lineal, a pesar de que si son ensambladas por NRPS's (Luo et al., 2015).

1.6 La colonización de la rizósfera por *B.subtilis*

El efecto benéfico que bacterias del tipo PGPR ejercen sobre los cultivos puede verse limitado debido a una pobre colonización de la raíz. Para colonizar los diferentes hábitats, estos microorganismos emplean mecanismos de desplazamiento como “swarming” (deslizamiento de grupos de bacterias en forma de película por medio de flagelos), “swimming” (desplazamiento de bacterias individuales por flagelos en medio semisólido), “twitching” (movimiento por contracción de pili bacterianos), “gliding” (deslizamiento sin ayuda de apéndices) y “sliding” (extensión sobre una superficie usando compuestos tensoactivos), los cuales dirigen las bacterias a rizodepósitos de nutrientes (Kearns, 2010). Diferentes evaluaciones empleando mutantes con genes de movilidad alterados o sin flagelos, han determinado que la pérdida en la capacidad de movimiento está relacionada con el detrimento en la capacidad de colonizar diferentes nichos (Gao et al., 2016). Además de los mecanismos de movimiento bacteriano, la presencia de compuestos como los LPs se ha relacionado con la colonización bacteriana debido a la reducción de la tensión superficial en el medio, lo que facilita el transporte de los microorganismos (Aleti et al., 2016). A su vez, estos compuestos también se han relacionado con la formación de biopelículas bacterianas y con la comunicación bacteriana (*Quorum Sensing*) (Bais et al., 2004). La relación entre movilidad bacteriana-producción de lipopéptidos-comunicación celular y formación de biopelícula parece presentar información clave para dilucidar la colonización de superficies por microorganismos de la especie *B.subtilis* (López et al., 2009; Oslizlo et al., 2014).

1.6.1 Formación de biopelículas y colonización de la rizósfera

Las biopelículas microbianas están conformadas por células móviles, no móviles y esporas, las cuales se encuentran embebidas en una matriz de proteínas, exopolisacáridos (EPs) y DNA, producida por las mismas células (Branda et al., 2006). Los EPs generan gradientes de presión osmótica en la superficie, que permiten a los microorganismos extenderse y adquirir nutrientes, mientras que la parte proteica está conformada por las proteínas TsaA y BslA las cuales polimerizan las fibras amiloides y se encargan de la hidrofobicidad de la superficie respectivamente (Vlamakis et al., 2013). La producción de EPs es regulada por el operón *epsA-O*, la producción de las proteínas la regula el operón *tapA-sipW-tasA*, y el gen *bslA* codifica la generación de la película. Estos operones son regulados por el represor

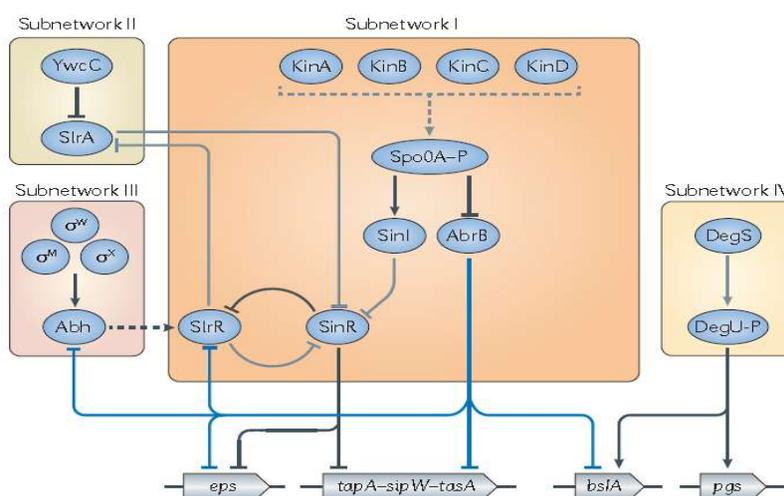
SinR y el antirepresor SinI, este último activado por la proteína reguladora maestra Spo0A, la cual tiene una gran importancia en la expresión de más de 500 genes, algunos de ellos relacionados con procesos como la esporulación de microorganismos y formación de biopelícula. Spo0A desencadena una cascada de señalización por medio de su fosforilización, la cual es controlada por cinco histidin- kinasas (KinA-KinE) y algunas fosfatasas, en respuesta a señales del ambiente (Beauregard et al., 2013; Stephenson & Perego, 2002). La concentración de Spo0A-P determina la expresión génica de la célula, niveles intermedios de la proteína inducen la expresión de la matriz de la biopelícula y niveles altos desencadenan la esporulación de las células. Para la activación de la expresión de la matriz de biopelícula se pueden presentar varias rutas, las cuales se presentan en la Figura 1-1.

La primera es la subred I, en la que Spo0A se fosforila con ayuda de las kinasas A, B, C y D. La fosforilación comienza en Spo0F, pasando el fosfato a Spo0B y de ahí a Spo0A, quien controla la actividad del regulador maestro SinR. Este tiene la capacidad de reprimir los operones *eps* y *TapA-sipW-tasA*, pero cuando se expresa SinI, se bloquea la actividad de SinR, haciéndolo incapaz de unirse al DNA. Spo0A también reprime a AbrB, un represor de genes de producción de biopelícula, el cual a su vez reprime los operones involucrados en el proceso de la formación de BslA y las proteínas reguladoras SlrR y Abh. La proteína SlrR es esencial debido a que forma un complejo SinR-SlrR y dirige a SinR lejos de la ruta para que no reprima los operones del proceso de biopelícula, y el complejo SlrR-SinR forma un interruptor que produce dos posibles estados del sistema: Uno en el cual los niveles de SlrR son bajos, esto ocurre cuando las células están individualmente organizadas y son móviles; o un estado donde los niveles de SlrR son altos, cuando las células se organizan en cadenas o producen la matriz. Este interruptor es controlado por SinI, a su vez controlado por Spo0A. Al inhibirse SinR se permite la derepresión de *slrR*, alcanzando la acumulación de SlrR y produciendo la biopelícula; pero a niveles de SlrR bajos no hay formación de la matriz.

La segunda subred comprende a YwcC y SlrA. Esta última es paróloga de SinI, antireprimiendo a SinR. El gen *slrA* es reprimido por YwcC y cuando recibe algunas señales de estrés, *slrA* se dereprime y se inducen los genes de formación de biopelícula. Esta ruta tiende a activarse como protección de las células. En la ruta III, la transcripción de *slrR* es activada indirectamente por la proteína reguladora Abh. El gen *abh* es reprimido a si mismo

por AbrB y su transcripción es regulada por factores- σ que a su vez se activan con estímulos externos. Esta ruta provee a Spo0A mecanismos indirectos para respuestas a condiciones externas. La última ruta, la subred IV, codifica los genes *bsiA* y del operón *pgs* (para síntesis de PGA- poly- β -1,6-*N*-acetyl-D-glucosamina) y comprenden el sistema de dos componentes denominado DegS-DegU. En este sistema DegS actúa como la histidin-kinasa que fosforila a DegU y este a su vez es un regulador de procesos celulares como la motilidad (Vlamakis et al., 2013).

Figura 1-1. Esquema simplificado de la ruta regulatoria que controla la formación de biopelícula en *B.subtilis* (Vlamakis et al., 2013).



Las líneas azules y grises oscuras indican la regulación transcripcional. Líneas grises claras indican interacciones entre proteínas. Líneas sólidas indican regulación directa y líneas intermitentes indican regulación indirecta.

Adicionalmente se conoce que señales moleculares como la presencia de surfactina, el fungicida nistatina, el antibiótico valinomicina, moléculas pequeñas como ácido málico y las toxinas del proceso de canibalismo de bacterias del género *Bacillus*, como SkfA ó SdpC, son activadores de estas rutas de señalización (Vlamakis et al., 2013). La producción de biopelícula se ha visto directamente relacionada con la capacidad de diferentes cepas de *Bacillus* para colonizar raíces, no sólo a nivel de laboratorio sino también *in vivo* (Zhang et al., 2015). Varios estudios realizados muestran que al mutar los genes implicados en la formación de biopelículas, se reduce o se pierde por completo la colonización del microorganismo evaluado en la rizósfera (Bais et al., 2004; Zhou et al., 2016).

1.6.2 Los LPs, su relación con la formación de biopelícula y la colonización de la rizósfera

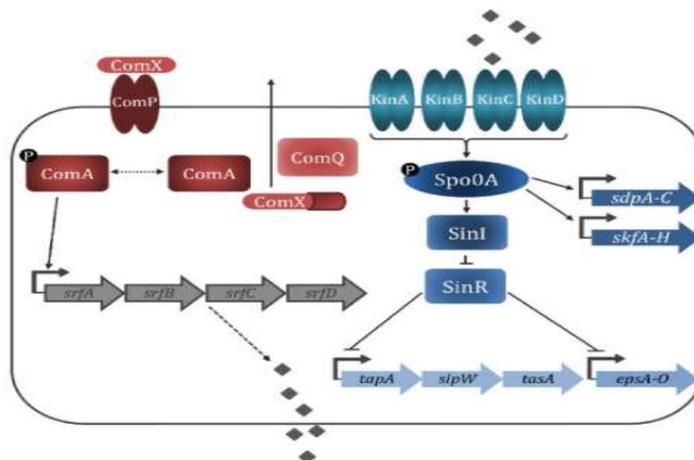
Las surfactinas poseen la capacidad de intervenir en los procesos de colonización por parte de PGPR's en la raíz (Bais et al., 2004) y ayudan a la motilidad de las células favoreciendo el deslizamiento de los microorganismos en sus nichos (Kearns et al., 2004); adicionalmente, se sabe que estos compuestos son percibidos por las células vegetales y pueden mediar en la activación de defensa de la planta, por lo que se han incluido dentro del grupo de los MAMPs ("Microbe Associated Molecular Patterns") junto con LPs como la micosubtilinas y fengicinas (Chandler et al., 2015). Además, pueden elicitar resistencia sistémica y permiten hacer un "priming" en la planta, para cuando los patógenos lleguen estar preparados para contraponerse a la infección (Nihorimbere et al., 2012). En la rizósfera, las concentraciones que se detectan de estos compuestos son bajas y difíciles de cuantificar debido a la absorción de metabolitos en las partículas del suelo, motivo por el cual muchos de los trabajos para detección del compuesto en rizósfera se realizan en hidroponía o medio de cultivo sintético (Pertot et al., 2013).

La producción de surfactinas se regula en *B.subtilis* por un mecanismo de respuesta a la densidad celular controlado por el péptido ComX o el factor de competencia y esporulación (CFS) (Jung et al., 2012). Estos péptidos, se secretan hacia afuera de la célula y tienen la capacidad de activar la histidin-kinasa ComP, que a su vez fosforila el factor transcripcional ComA y produce la transcripción de un "regulon" que incluye el operón *srf*, responsable de la producción de la surfactina. Esta surfactina activa de forma indirecta el grupo de kinasas A, B, C y D; y específicamente a la histidin-kinasa KinC, la cual fosforila el regulador maestro Spo0A y activa la producción de biopelícula por la vía SinI-SinR (Bloom-Ackermann et al., 2016; López et al., 2009). En este punto el proceso de producción de biopelícula y el proceso de producción surfactina convergen (Figura 1-2).

Estudios empleando *B.subtilis* 6051 como biocontrolador del patógeno *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000, demostraron que la eficiencia del biocontrol estaba relacionada con la presencia de biopelícula en zonas diferenciales de la raíz y por la producción de surfactina. Este trabajo sentó las bases para la relación entre la producción de LPs y la colonización radicular de PGPR's (Bais et al., 2004). Desde entonces se determinó que el proceso de QS en bacterias está directamente relacionado con procesos

de formación de biopelícula, de LPs y de adherencia de microorganismos a las raíces (Oslizlo et al., 2015).

Figura 1-2. Señalización para producción de surfactina y biopelícula (Bloom-Ackermann et al., 2016).



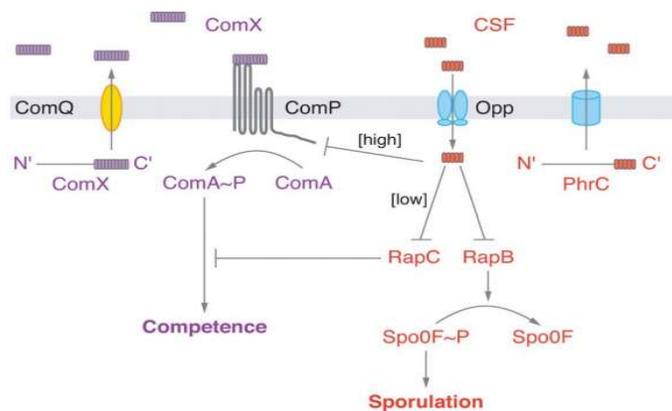
Los cuadros rojos corresponden a proteínas relacionadas al proceso de producción de surfactina, flechas grises a los genes del operón *srf*, rombos grises son las moléculas de surfactina, cuadros y elipses azul oscuras son las proteínas de la ruta de formación de biopelícula, las flechas azul claras son los genes del operón para producción de biopelícula. Se presentan elipses verde-azules para las enzimas y proteínas relacionadas con esporulación y las flechas azules oscuras son los operones relacionados a la esporulación.

1.6.3 Quorum Sensing y la colonización

La comunicación celular bacteriana o QS es un proceso en el que se producen y emplean moléculas señal denominadas autoinductores, los cuales generan respuestas dependientes de la concentración. Las bacterias detectan la acumulación de los autoinductores y al llegar al umbral requerido, alteran la expresión de genes y su comportamiento (Waters & Bassler, 2005). Moléculas como fumarato, citrato, malato, polisacáridos de las plantas, LPs como las surfactinas o fengicinas, feromonas como ComX, entre otros, son algunos autoinductores (Beauregard, 2015). Esta señalización controla procesos como la producción de biopelículas, motilidad, entre otros (Oslizlo et al., 2014; Rai et al., 2015). Las bacterias que se encuentran en la rizósfera de las plantas pueden emplear el QS para modular las interacciones con las plantas, incluyendo la liberación de toxinas o de antibióticos. Algunos de los inductores cambian entre géneros y aún entre especies, y se conoce que compuestos como las AHLs (Acil Homoserin Lactonas) son moléculas

autoinductoras de proteobacterias, las gama-butirolactonas de especies de *Streptomyces*, el ácido cis-11-metil 2-dodecanóico (DSF) en especies de *Xanthomonas*, *Xyllela* y géneros cercanos, y algunos oligopéptidos juegan este rol en bacterias Gram positivas, adicionalmente, algunas de ellas se relacionan con la colonización de la planta (Bloom-Ackermann et al., 2016). De manera similar a los mecanismos por los cuales bacterias Gram negativas emplean proteínas LuxI y LuxR en su sistema de QS (Nunes-Halldorson & Duran, 2003), los organismos Gram positivos tienen moléculas señal que son detectadas por sensores. Este proceso en *B. subtilis* emplea dos autoinductores principales: ComX, el cual es procesado y secretado por ComQ, detectado por ComP (un sensor de histidin-kinasa) y unido a este último, donde se fosforila y luego transfiere el fosfato a ComA, quien regula la transcripción de muchos de los genes que codifican factores requeridos en la competencia (Ver Figura 1-2 cadena de señalización en rojo); y el CSF, otro oligopéptido, el cual es codificado por *phrC*, y que es secretado por medio del sistema secretor celular y posteriormente liberado al medio. Este oligopéptido es tomado por el péptido transportador Opp y llevado al citoplasma. Allí se une a una proteína denominada RapC e interrumpe la unión de RapC a ComA. Si RapC se une a ComA se inhibe el desarrollo de competencia, pero al no permitir esta unión, CSF promueve la competencia celular. A altas concentraciones, CSF inhibe la ruta de señalización de ComP-ComA y favorece el proceso de esporulación.

Figura 1-3. Quorum Sensing de *B. subtilis* para la competencia ó el proceso de esporulación



1.6.4 La producción de exudados por la planta y su relación con la colonización de *B.subtilis*

Las plantas liberan al suelo en forma de exudados radicales entre un 10-44% del carbono que han tomado para sus funciones metabólicas. Estos exudados pueden ser aminoácidos (ácido glutámico, ácido aspártico, leucina, isoleucina, lisina, etc.), ácidos orgánicos (especialmente ácido cítrico, málico, succínico, entre otros) y azúcares (xilosa, glucosa, principalmente); atrayendo hacia la raíz muchos microorganismos y generando rizodepósitos con una concentración bacteriana entre 10 a 1000 veces mayor que en el suelo (Lugtenberg & Kamilova, 2009). En estos rizodepósitos las bacterias reciben nutrientes y se desarrollan, generando interacciones con la planta, además en ellos se encuentran exudados radicales que juegan un rol importante en la comunicación entre la planta y la bacteria, atrayendo o repeliendo microorganismos hacia la raíz (Bais et al., 2004). Los ácidos orgánicos enunciados son algunos de los exudados que generan un comportamiento quimiotáxico con las bacterias de la rizósfera, pero se ha determinado que el tipo de compuesto exudado es dependiente de la especie vegetal, por lo que existe una selección de la microbiota de la raíz de acuerdo a los exudados producidos (Zhang et al., 2014).

La quimiotaxis permite la atracción de los microorganismos a la raíz, posteriormente se da el proceso de adherencia a la raíz, empleando mecanismos como las biopelículas (Rudrappa et al., 2008a). Sin embargo, estas biopelículas no se producen en toda la longitud de la raíz sino que dependen de la secreción de compuestos orgánicos, la cual fluctúa a lo largo de esta, presentando una distribución heterogénea de los microorganismos. Estudios realizados por Rudrappa et al., 2008b empleando la PGPR *B.subtilis* FB17, se presenta la colonización diferencial de las raíces de *Arabidopsis thaliana* por medio de la producción de biopelículas heterogéneas, con diferencias marcadas entre la punta y las zonas de mayor madurez de la raíz. En estos estudios se determinó también que *A. thaliana* exuda al medio señales químicas específicas con el fin de atraer microorganismos benéficos a la raíz y favorecer su adherencia y formación de biopelícula. Además se determinó que al infectar las plantas con *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 se secreta ácido málico en las raíces, generando una comunicación quimiotáctica con el microorganismo benéfico; atrayéndolo a la rizósfera.

1.7 Efecto de la aplicación de *B.subtilis* como inoculante biológico en diferentes cultivos

Los impactos ecológicos que la aplicación de PGPR's en planta pueden generar en las poblaciones nativas de la rizósfera no han sido bien estudiados, y los reportes muestran contradicciones en sus resultados debido a diferencias en las técnicas empleadas (Trabelsi & Mhamdi, 2013). Por esto, se deben esclarecer resultados y evaluar el riesgo ambiental asociado a la introducción de organismos foráneos a los sistemas de producción agrícola. Si bien se conoce que los efectos negativos de estos microorganismos son menores que los generados por la aplicación de compuestos químicos (Berg, 2009), pueden existir riesgos ecológicos asociados a estas inoculaciones. Diferentes investigaciones han determinado el efecto de la aplicación de PGPR's sobre comunidades nativas del suelo y la rizósfera (Choudhary & Johri, 2009; Felici et al., 2008; Piromyou et al., 2011) y se ha encontrado que el efecto de las PGPR puede variar dependiendo de la microbiota presente en los sustratos, y que la inoculación puede generar cambios en los patrones de distribución de poblaciones rizosféricas; aportando a la falta de reproducibilidad en los resultados debido a las interacciones que pueden presentarse entre las cepas aplicadas con los microorganismos nativos y/o con condiciones abióticas (Buddrus-Schiemann et al., 2010). Las técnicas empleadas para evaluar el efecto sobre estas poblaciones comprenden técnicas clásicas de cultivo en superficie a nivel de laboratorio (Kokalis-Burelle et al., 2006), uso de T-RFLP (*Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Chowdhury et al., 2013), empleo de PCR-DGGE (Reacción en cadena de la polimerasa) y posterior electroforesis en gel con agente desnaturizante (de-Bashan et al., 2010), PCR's simples (Piromyou et al., 2011), qPCR (Babic et al., 2008) y técnicas de nueva generación como el uso de la metagenómica (Krober et al., 2014), pero el complemento entre las técnicas podría dilucidar la respuesta a la interacción de PGPR's con otros microorganismos presentes en la rizósfera.

2. Potencial bioquímico y genómico de *B. subtilis* EA-CB0575 asociado a mecanismos de promoción de crecimiento vegetal

2.1 Resumen

La cepa *Bacillus subtilis* EA-CB0575, aislada de la rizósfera de banano (*Musa AAA*) variedad Valery, es potencial PGPR y podría ser principio activo de productos bioinoculantes. En este capítulo se presenta la secuenciación, ensamble y anotación de genes en su genoma, para determinar el potencial genómico asociado a los mecanismos de promoción de crecimiento vegetal. Los genes o predicciones metabólicas obtenidas se relacionaron con el potencial bioquímico *in vitro* y con la promoción de crecimiento a nivel de invernadero *in planta*. La secuencia del genoma de *B. subtilis* EA-CB0575 se obtuvo por el método Illumina y se ensambló empleando el software Velvet 1.2.10, obteniendo un genoma de 4,09 Mb con 4332 genes, algunos de ellos relacionados con la capacidad de promoción de crecimiento vegetal y secuencias de genes homólogos a la biosíntesis de compuestos antibióticos tipo LPs de las familia surfactinas y fengicinas. Se comprobó la producción *in vitro* de índoles totales, sideróforos, surfactinas, fengicinas, la capacidad de solubilización de roca fosfórica y la posible fijación de nitrógeno mediante pruebas bioquímicas *in vitro*. Se realizó un análisis filogenético del genoma completo empleando 31 genomas de la especie reportados y se determinó que el microorganismo pertenece al clado de *B. subtilis* subespecie *subtilis*. Finalmente, se encontró que el microorganismo promueve el crecimiento de plantas de tomate (*Lycopersicon sculentum*) variedad Chonto-Santa Cruz, alcanzando un aumento significativo de peso seco total (PST) entre el 25,4 y 34,6% en las plantas inoculadas respecto a plantas control. Estos resultados sugieren que *B. subtilis* EA-CB0575 posee un potencial alto para ser usado en aplicaciones agrícolas y brindan un punto de partida que permitirá dilucidar algunos de los mecanismos de acción descritos como rasgos PGPR.

2.2 Introducción

Miembros de los géneros *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, entre otros, han sido empleados para el desarrollo de insumos aplicados a cultivos de interés

económico (Kumar et al., 2011). Algunas cepas de estos géneros tienen una relación simbiótica con las plantas y promueven su crecimiento por mecanismos como producción de fitohormonas, mejoramiento en la toma de nutrientes, producción de antibióticos, ISR ó competencia por nicho o sustrato (Glick, 2012), por lo que se denominan PGPR's (Plant Growth Promoting Rhizobacterias) y podrían emplearse como principio activo de inoculantes agrícolas (Grobelak et al., 2015). Múltiples cepas de la especie *B. subtilis* se han reportado como bioestimulantes y biocontroladoras, generando interacciones positivas con las plantas y mejorando la productividad del cultivo (Kumar et al., 2011). Características de la especie como la resistencia a las condiciones de estrés debido a la formación de esporas, el amplio espectro de metabolitos que produce y su naturaleza ubicua, hacen de ella una especie bacteriana promisoría para la generación de productos biotecnológicos (Toyota, 2015).

B. subtilis es una de las especies bacterianas de mayor estudio a nivel morfológico, fisiológico y genómico, su cepa tipo es *B. subtilis* Marburg 168, aislada después de la mutación de *B. subtilis* ATCC6051 con rayos X, y hoy en día es una cepa domesticada en laboratorio y empleada para investigaciones en diferentes áreas (Earl et al., 2008). Su genoma fue el primero en secuenciarse para la especie, en 1997, luego de 10 años de trabajo entre 35 laboratorios del mundo (Kunst et al., 1997; Moszer, 1998) y los resultados de esta secuenciación han brindado información sobre la esporulación, germinación, nutrición y desarrollo de la especie. A partir de este trabajo se determinó que la cepa posee un genoma de 4,2 Mb, 4100 genes que codifican proteínas, de los cuales el 53% tienen una única copia y una cuarta parte del genoma corresponde a genes duplicados, cerca del 4% de su genoma está compuesto por genes que codifican la producción de metabolitos secundarios como antibióticos y moléculas derivadas y otro 4% de estos genes se emplean para procesos como la esporulación y la germinación. Adicionalmente, se encontró la presencia de profagos o remanentes de profagos, que brindan indicios del proceso evolutivo de estos microorganismos, y una gran porción de sus genes se relacionan con el metabolismo de carbono, incluyendo moléculas derivadas de las plantas (Earl et al., 2008; Kunst et al., 1997).

La evaluación del genoma de la cepa ha permitido tener precisión en la sistemática del género y conocer las adaptaciones de este taxón en su hábitat natural (Wipat & Harwood, 1999) y hoy en día existen diversos reportes de secuenciaciones de genomas para cepas

de *Bacillus* como BEST 195 (Nishito et al., 2010); WN724, WN715 y WN716 (Brown et al., 2011); W23 (Zeigler et al., 2008); JH642, AG1839 (Smith et al., 2014); BsD-2 (Li et al., 2016); además de realizar genómica comparativa y determinar la diversidad genómica de la especie. Sumado a la disponibilidad de genomas, los avances de la bioinformática, el acceso a programas “open source” y la existencia de bases de datos públicas; han brindado la posibilidad de avanzar en áreas como la filogenética molecular, el desarrollo de marcadores moleculares y genes reporteros, detección de genes de interés, desarrollo de métodos de detección *in situ*; y en general, desde procesos diagnósticos hasta análisis transcriptómicos (Delseny et al., 2010; Vincent et al., 2016).

Hasta hace unos pocos años, estos genomas se secuenciaban empleando métodos clásicos como Sanger. Sin embargo, limitaciones en la cantidad de bases secuenciadas por tiempo, su precisión y costo, hicieron que se desarrollaran métodos avanzados denominados de nueva generación (NGS, por sus siglas en inglés), con mejoras en el rendimiento y reducción de costo por base (Lin et al., 2012). Entre ellos se destacan el método Illumina (con los equipos Miseq y Hiseq), Ion Torrent systems (pirosecuenciación 454 de Roche®), SOLiD de Applied Biosystems®, PacBio de Pacific Biosystems y Oxford Nanopore (Min Ion system); que emplean secuenciaciones en paralelo para producir gran cantidad de información por corrida y dilucidar genomas de gran tamaño (Ansorge, 2016; Logares et al., 2012). Una vez secuenciadas, las lecturas obtenidas por alguno de estos métodos, se ensamblan y se ordenan, empleando programas computacionales como Velvet 1.2.10 (Zerbino & Birney, 2008), SOAP de novo 2.04 (Luo et al., 2012) ó Mira 3.4 (Chevreux, 2007) empleando algoritmos de grafos y un genoma completo de la misma especie como referencia, ó *de novo* es decir, sin referencia (Vincent et al., 2016). Posteriormente, es posible predecir los genes presentes usando anotadores, como el RAST, Artemis, ERGO, entre otros (Siezen & Van Hijum, 2010); y usando los genes ortólogos entre especies se pueden realizar comparaciones filogenéticas con otros genomas de interés (Ivanova et al., 2003).

Esta estrategia permite determinar el potencial genómico de las cepas, ver diferencias con genomas de la misma especie o especies alejadas; y enriquecer el conocimiento científico sobre procesos bioquímicos y microbiológicos de los organismos de interés. Se han reportado trabajos donde se presenta el genoma total de cepas con potencial PGPR y se presenta la evaluación de potencial genómico y bioquímico de estos microorganismos,

encontrando cepas que podrían ser el principio activo de productos inoculantes para la agricultura (Majeed et al., 2015; Gupta et al., 2014).

En este capítulo se presenta la secuenciación, ensamblaje, y caracterización del genoma de *B. subtilis* EACB0575, microorganismo aislado de un cultivo comercial de *Musa* AAA en Urabá, Antioquia, Colombia (Ramírez C, 2012) y que en estudios previos presentó potencial promotor de crecimiento en cultivos de banano, maíz y crisantemo (Cuellar & Posada U., 2013). Se determinaron los genes homólogos asociados a la biosíntesis de compuestos implicados en los mecanismos de promoción de crecimiento vegetal y se evaluaron los rasgos bioquímicos relacionados a estas características a nivel *in vitro*. Además se determinó el potencial promotor de la cepa a nivel de invernadero en tomate, como punto de partida para relacionar el potencial genómico y bioquímico encontrado con la actividad del microorganismo *in planta*.

2.3 Metodología

2.3.1 Microorganismos y condiciones de cultivo

La cepa *B. subtilis* EA-CB0575 fue aislada de la rizósfera de banano cv. Valery (*Musa* AAA) en Urabá, Antioquia, Colombia (Nororientado de 07°51'58.6"N, -76°37'39"W) en 2009 (Ramírez C., 2012) y se identificó por la secuenciación del gen 16s rDNA (No Acceso KC170988). Se caracterizó morfológicamente y se almacenó a -80°C usando caldo tripticasa de soya (TSB, 105459, Merck) suplementado con glicerol (20% v/v) y se registró en la Colección de bacterias aisladas de *Musa* # 191 del Instituto Alexander Von Humbolt, Bogotá Colombia bajo el nombre *Bacillus subtilis* EA-CB0575. Es un Bacilo Gram positivo (1,85 ± 0,31 µm), formador de espora central (0,72 ± 0,15 µm), con colonias irregulares, de borde entero, elevación crateriforme, rugosa mate y de color blanco-crema en medio TSA x 0,5 (105458, Merck). Para las pruebas bioquímicas y evaluaciones *in planta* realizadas se evaluaron además las cepas *B. subtilis* 168 y *B. amyloliquefaciens* FZB42, facilitadas por el Dr. Camilo Ramírez de la Universidad de Antioquia y el Dr. Rainer Borriss de ABITEP GmbH ABI, Alemania.

2.3.2 Identificación del microorganismo de estudio

El DNA de *B. subtilis* EA-CB0575 fue obtenido de un cultivo del microorganismo en medio TSB empleando el Kit de extracción Ultraclean Microbial DNA isolation Mobio (Mobio, 12224) y se empleó para la amplificación del gen 16S rDNA usando los primers 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) y 1492R (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3') (Weisburg et al., 1991). Para la PCR se emplearon 0,02 U de Taq Polimerasa Thermo Scientific 5U/mL EP0402; 0,2 mM de cada primer; 0,2 mM de un mix de dNTP's; 1,5 nM de MgCl₂; 1X del buffer de la Taq y 1 μL de DNA. El volumen de la reacción se ajustó a 50 μL empleando agua ultrapura libre de DNAsas (Amresco, E479). Se empleó una temperatura de alineamiento de 60°C (20 s), una desnaturalización inicial a 94°C (3 min), 30 ciclos de amplificación con desnaturalización a 94°C (30 s) alineamiento 20 s y extensión a 72°C (90 s), seguida por una extensión final a 72°C (5 min). Los productos de la PCR fueron evaluados por medición en NanoDrop 2000 (Thermo Scientific™) y por prueba de integridad en gel de agarosa al 1%. Las muestras amplificadas fueron secuenciadas por el método Sanger, empleando la pareja de primers 8F y 907R (5'-CCGTCAATTCMTTTRAGTTT-3'). Una vez obtenida la información de la secuenciación, fue evaluada con los programas BioEdit v.7.2.5 y Mega 6.0 con el fin de determinar la identidad de los DNA amplificados.

2.3.3 Secuenciación y anotación del genoma

El DNA genómico de *B. subtilis* EA-CB0575 fue obtenido de un cultivo líquido en TSB con 12 h de desarrollo (fase exponencial de crecimiento) y extraído empleando el Kit Ultraclean Microbial DNA isolation Mobio según condiciones enunciadas por el proveedor. La calidad del DNA se verificó por medio de una electroforesis en gel de agarosa 1%, empleando 3 μL de DNA y 1 μL de una mezcla de SYBR Gold (S11494, Life Technologies) y buffer de carga (R0611, ThermoScientific) como intercalante, además se midió la concentración del DNA y la relación 260/280 empleando NanoDrop 2000 (Thermo Scientific™). El genoma de *B. subtilis* EA-CB0575 fue secuenciado empleando el sistema Illumina HiSeq 2000, por el método paired-end con reads de 100 nt y tamaño promedio de inserto de 265 pb. La calidad de los archivos de datos FASTQ, resultantes del secuenciación, se verificó con el software FastQC (Andrews, 2010). Las lecturas se depuraron con el fin de cortar secciones de baja calidad por medio del software Trimmomatic versión 0.35 (Bolger et al., 2014) con los parámetros SLIDINGWINDOW:10:20 LEADING:20 TRAILING:20 MINLEN:80. El ensamble

del genoma se realizó con el software Velvet versión 1.2.10 (Zerbino & Birney, 2008) variando el valor del k-mer hasta obtener el ensamble con menor fragmentación (k-mer=95). Se determinaron las diferentes estadísticas del ensamble: longitud total de genoma (pb), N₅₀, N₉₀, tiempo de corrida (min), número de clusters y tamaño medio del cluster (pb), con el fin de seleccionar el mejor ensamble posible, y una vez obtenido, se descartaron los clusters con una longitud menor a 1 Kpb y se recalcularon las estadísticas. Posteriormente, se procedió a la predicción del ORI (Origen de replicación) del contig 1 empleando el software OriFinder (Gao & Zhang, 2008) y se empleó el software RAST (Aziz et al., 2008) para determinar ORF's (Open Reading Frames) y el orden de los contigs. En esta etapa del proceso se emplearon el alineador ProgressiveMauve (Darling et al., 2010) y el software de búsqueda de homología Murasaki (Popendorf et al., 2010). Se empleó el *B.subtilis* 168 como cepa de referencia. Una vez ensamblado el genoma se realizó la predicción y anotación de genes presentes empleando el RAST (<http://rast.nmpdr.org/>). Con el ensamble ordenado se procedió a la representación circular del genoma empleando el software CIRCOS 0,66 (Krzywinski et al., 2009) y se realizó el análisis de las secciones terminales de los fragmentos del secuenciación, determinando los genes presentes en estas regiones; para lo cual se compararon los resultados del anotador respecto al BLASTn (Altschul et al., 1990). Adicionalmente se realizó la búsqueda de secciones del genoma que podrían predecir la producción de rasgos PGPR.

Para evaluar la producción de AIA (ácido indol acético, un tipo de indol), de sideróforos y de compuestos volátiles se tomó como base la predicción metabólica del RAST que muestra la presencia de actividades enzimáticas que podrían sustentar la producción de estos compuestos. Para la solubilización de fosfatos y la fijación de nitrógeno, se determinó la presencia de los genes *phy* y *nif* que codifican para la producción de fitasas y nitrogenasas respectivamente. Esta búsqueda se hizo empleando cepas referencia en las que se reconoce la presencia del gen de interés ó se ha determinado la producción de los metabolitos (*B. amyloliquefaciens* FZB42 para AIA, volátiles y sideróforos, *B.subtilis* 168 para producción de fitasas y *Klebsiella pneumoniae*, número de acceso al Genbank X13303.1, para fijación de nitrógeno) y se realizó un BLAST local de las secuencias de las referencias vs. *B.subtilis* EA-CB0575. Posteriormente, se empleó un procedimiento combinado entre la anotación metabólica del RAST (herramienta KEGG) y la búsqueda de genes de interés en rutas metabólicas alternas, con el fin de encontrar los genes relacionados a los rasgos PGPR en el genoma de la cepa de *B.subtilis* EA-CB0575.

Específicamente, para la fijación de nitrógeno, la búsqueda de genes del cluster *nif* se realizó por comparación de homología con secciones de la cepa de interés, sin emplear el KEGG.

2.3.4 Identificación y caracterización de cluster génicos NRPS

Se evaluó la presencia de regiones codificantes de NRPS en el genoma de *B.subtilis* EA-CB0575. Para esto se emplearon secuencias homólogas a regiones codificantes de la cepa referencia *B. amyloliquefaciens* FZB42 (GenBank Accesion number: CP000560.1) productora de 3 familias de LPs (Koumoutsi et al., 2004) y se empleó el algoritmo BLASTn (Camacho et al., 2009) con el fin de contrastar las diferencias en las secuencias de los operones en todo el genoma del microorganismo, posteriormente se empleó el software Murasaki 1.68.6 (Popendorf et al., 2010) y se procedió a determinar los ORF y las secuencias codificantes en las regiones de interés empleando los software RAST y el predictor de operones FgenesB (Softberry, Inc., NY, USA). En esta etapa se contrastó la información de las regiones genómicas con la reportada en la literatura para *Bacillus* spp. (Aleti et al., 2015) y se realizó una predicción de los dominios estructurales para las secuencias correspondientes a las regiones relacionadas con cada ORF encontrado, esto se ejecutó por medio de la base de datos CDD (Marchler-Bauer et al., 2011).

2.3.5 Genómica comparativa de *B.subtilis* EA-CB0575 y estudio filogenético

Se realizó una comparación entre los genomas anotados de *B.subtilis* 168 (GenBank:NZ_CM000487.1), *B. amyloliquefaciens* FZB42 (GenBank:CP000560.1) y la cepa EA-CB0575, con el fin de localizar clusters génicos que podrían estar involucrados en la producción de metabolitos secundarios. Para este proceso se empleó el software de homología Murasaki 1.68.6 (Popendorf et al., 2010) determinando las secuencias conservadas entre los genomas evaluados. Para la localización de los clusters génicos se empleó la herramienta GMV del mismo software Murasaki. Para comparar filogenéticamente los genomas obtenidos de las cepas *B.subtilis* EA-CB0575 y otros *Bacillus* spp. seleccionados entre los reportados en las bases de datos, se realizó la construcción de un árbol filogenético y posterior análisis. Inicialmente, se realizaron árboles filogenéticos a partir de 5 genes *housekeeping* (*rpoB*, *gyrA*, *purH*, *polC* y *groEL*) de 31 *Bacillus* spp.) y un microorganismo de un grupo externo (

Tabla 2-1) usando los métodos de inferencia bayesiana (IB) y máxima verosimilitud (ML). Se seleccionaron estos genes debido a que su nivel de variación en *Bacillus* spp. permite mayor resolución que el gen 16S rDNA. El primero de ellos, *rpoB*, corresponde a la subunidad B de la RNA polimerasa; *gyrA*, a la subunidad A de la DNA girasa; *purH*, codificante para la enzima del metabolismo de purinas fosforribosilaminoimidazolcarboxiamida formiltransferasa; *polC*, de la subunidad alfa de la DNA polimerasa III y *groEL*, a la proteína de choque térmico de 60kDa groEL (Rooney et al., 2009). Para la extracción de estas secuencias codificantes se empleó el script (extract_genes.py) en Python 2.7.6, desarrollado por el grupo de trabajo; usando módulos del paquete Biopython 1.65 (Anexo I) y se empleó el software MAFFT 7.213 para confirmar las secuencias de cada gen. Para el alineamiento de las secuencias se empleó una estrategia basada en el alineamiento de aminoácidos y se usó el alineador MAFFT 7.213 (Kato & Standley, 2013) con los parámetros por defecto en el programa y el modo automático. Los alineamientos fueron traducidos en forma reversa de aminoácidos a nucleótidos con el software RevTrans 1.4 (Wernersson & Pedersen, 2003).

Las secuencias de nucleótidos alineadas por gen se concatenaron en un único archivo FASTA y posteriormente se convirtieron a formato NEXUS por medio de ReadSeq 2.1.19 (Gilbert, 2003), y a formato Phylip usando un script en Phyton (Anexo I). El árbol filogenético se realizó con los métodos IB y ML. Se usó el software partitionfinder 1.1 (Lanfear et al., 2014) para encontrar el mejor esquema de particionado de los datos y los modelos de sustitución nucleotídica apropiados para cada partición. El análisis de BI se hizo por medio del software MrBayes 3.2.2 (Ronquist et al., 2012). Fueron efectuados cuatro análisis MCMC (Markov Chain Monte Carlo) independientes con 10 millones de generaciones y 8 cadenas (7 calientes y una fría) para cada uno. La frecuencia de muestreo fue cada 1000 generaciones y se utilizó un descarte de la fase de calentamiento (burnin) relativo de 35% de los árboles obtenidos al final. Con los árboles restantes se obtuvo el árbol filogenético consenso. El análisis por ML se realizó con garli HPC-MPI 2.07 (Bazinet et al., 2014). Se hizo una búsqueda con 8 réplicas y se seleccionó el de mayor probabilidad (*likelihood*), luego se efectuó un análisis con 1000 replicados de bootstrap para darle soporte al árbol. Para consolidar los árboles se empleó SumTrees 3.3.1 (Sukumaran & Holder, 2010). La visualización de los árboles obtenidos se hizo por medio de FigTree 1.4.1 (Rambaut, 2014). La raíz de ambos árboles fue fijada basándose en el grupo externo usado (*Peptoclostridium difficile*).

Tabla 2-1. Microorganismos empleados en el análisis filogenético

#	Número de acceso	Organismo	#	Número de acceso	Organismo
1	NC_006270.3	<i>Bacillus licheniformis</i> DSM 13ATCC 14580	17	CP000560.1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> str. FZB42
2	NZ_CP010524.1	<i>Bacillus licheniformis</i> BL-09	18	NC_016047.1	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> TU-B-10
3	NC_009848.1	<i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032	19	CP002183.1	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> str. W23
4	CP011150.1	<i>Bacillus pumilus</i> W3	20	NZ_CM000487.1	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> str. 168
5	NC_012659.1	<i>Bacillus anthracis</i> str. A0248	21	NZ_CM000489.1	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> str. JH642
6	NC_005957.1	<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>konkukian</i> str. 97-26	22	NZ_CM000488.1	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> str. NCIB 3610
7	NZ_CP009335.1	<i>Bacillus thuringiensis</i> HD1011	23	NZ_CM000490.1	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> str. SMY
8	NC_004722.1	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	24	NC_020507.1	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> 6051-HGW
9	NC_011969.1	<i>Bacillus cereus</i> Q1	25	NC_020832.1	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> str. BAB-1
10	NC_012472.1	<i>Bacillus cereus</i> 03BB102	26	NC_017195.1	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> str. RO-NN-1
11	NZ_CP009692.1	<i>Bacillus mycoides</i> ATCC 6462	27	NC_020244.1	<i>Bacillus subtilis</i> XF-1
12	NZ_CP007626.1	<i>Bacillus mycoides</i> 219298	28	CP002468.1	<i>Bacillus subtilis</i> BSn5
13	CP009746.1	<i>Bacillus weihenstephanensis</i> WSBC 10204	29	CP006881.1	<i>Bacillus subtilis</i> PY79
14	CP006952.1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> LFB112	30	-	<i>Bacillus subtilis</i> EA-CB0575
15	NC_022653.1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> CC178	31	-	<i>Bacillus subtilis</i> EA-CB0015
16	NC_014551.1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> DSM 7	32	NZ_LN614756.1	<i>Peptoclostridium difficile</i> CD630DERM

2.3.6 Caracterización fenotípica de *B.subtilis* EA-CB0575

- Producción de índoles:** La producción de índoles se determinó usando el método colorimétrico de Salkowsky (Patten & Glick, 2002). Para esta evaluación, el microorganismo se cultivó en 10 mL de TSB suplementado con 500 mg/mL de L-triptófano (A10230, Alfa Aesar) y se incubó a 150 rpm y 30°C por 48 h. El cultivo se centrifugó a 3250 g por 15 min y el sobrenadante obtenido se mezcló con la solución de Salkowsky en una relación (1:4). La generación de una coloración fucsia-rosado fue indicativo de producción de índoles y se midió espectrofotométricamente a 530 nm. La concentración de índoles totales se determinó por medio de una curva de calibración con una solución etanólica 1 mg/mL de AIA (I885, Phytotechnology Laboratories,) entre 0-50 mg/mL.

- **Producción de sideróforos:** La producción de sideróforos se determinó por el método colorimétrico CAS (Schwyn & Neilands, 1987). Para ello se empleó la solución CAS compuesta por una mezcla de la solución A (0,03025 g CAS Chromo-AzuroI S C1018, Sigma, en 25 mL de ADE (Agua destilada estéril), 5 mL de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1 mM en HCl 10 mM y 50 μL de KOH 10% (w/v)) y la solución B (0,03645 g de hexadeciltrimetil bromuro de amonio HDTMA, H6269, Sigma Aldrich, en 20 mL de ADE) con 600 μL de NaOH. Esta mezcla permitió la detección de los sideróforos en el sobrenadante del cultivo microbiano en TSB 10% a los 2 d de crecimiento, preparando una solución de 1 mL de sobrenadante con 1 mL solución reveladora. Un viraje de color desde un azul oscuro a rosa-violeta fue indicativo de la presencia de sideróforos. Se midió la absorbancia a 630 nm y se comparó con una curva de calibración entre 0 y 20 μM de NaEDTA mezclada con la solución CAS, en la proporción previamente enunciada.
- **Solubilización de fosfatos:** Se realizó el cultivo de *B.subtilis* EA-CB0575 en el medio NBRIP (1 g NaCl; 0,2 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,4 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1 g de NH_4NO_3 , 10 g de glucosa, 300 ppm de benomyl y 7 g de bactoagar) suplementado con 3,5 g/L de roca fosfórica comercial (Fosfatos del Huila, 28% de fósforo total P_2O_5), el cual brinda al microorganismo el fósforo de la roca fosfórica como única fuente del nutriente (Kim et al., 1997). El crecimiento del microorganismo en el medio indicó posible solubilización de fosfatos. Los resultados se confirmaron por medio del método del azul de molibdato (Murphy & Riley, 1962), en el cual el sobrenadante del cultivo en medio NBRIP sin agar se mezcló con una solución indicadora en una relación (1:4). La mezcla se dejó estabilizar por 1 h y se determinó la intensidad del color a 890 nm (viraje de color de un azul oscuro a azules más claros o violeta indican resultados positivos en la prueba). La solución indicadora estaba compuesta por 100 mL de la solución compuesta por 0,35 g $\text{K}_2(\text{C}_4\text{H}_2\text{O}_6\text{Sb})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$; 2,7 L de ADE; 168 mL de H_2SO_4 y 14,43 g de $(\text{NH}_4)_6\text{MO}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y 0,428 g de ácido ascórbico. Se realizó una curva patrón para comparar los resultados, empleando un estándar de K_2HPO_4 desde 5 a 20 μM .
- **Fijación de nitrógeno ambiental:** La fijación de nitrógeno (N_2) se evaluó por medio del crecimiento de *B.subtilis* EA-CB0575 en el medio NFb (Eckert et al., 2001). compuesto por ácido málico 5 g/L; KOH 4 g/L; K_2HPO_4 0,5 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g/L; CaCl_2 0,02 g/L; NaCl 0,1 g/L; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5; $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2 mg/L; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 10 mg/L;

solución al 0,5% de azul de bromotimol en 0,2 M KOH 2 mL; agar, 0,0175% y pH 6,8. Los cultivos se realizaron en recipientes de 20 mL sellados con tapón de caucho y se incubaron a 30°C en oscuridad y por una semana. La presencia de manto bacteriano y el viraje del color del medio (de verde a azul) sugieren la capacidad de fijación de nitrógeno por parte del microorganismo.

- **Producción de LPs:** La evaluación de la producción de LPs por parte de *B. subtilis* EA-CB0575 se realizó en cultivo sumergido en medio MOLP (Medium Optimal for Lipopeptide Production) (Jacques et al., 1999). Para esto se transfirieron 20 mL de un preinóculo del microorganismo de 12 h de crecimiento en un Erlenmeyer de 500 mL con 180 mL de medio y se incubó por 3 d a 30°C y 150 rpm. Al cabo de 12 h de incubación se adicionó 4% (p/v) de resina amberlita XAD-16 (Alfa Aesar®) previamente esterilizada al cultivo. Al terminar el tiempo de cultivo se lavó la resina con 400 mL de ADE y posteriormente con 200 mL de metanol. El extracto metanólico se evaporó a presión reducida en un rotoevaporador (50°C, -50 psig) hasta obtener un residuo sólido que se resuspendió en ADE (10 mL a una concentración de 37 mg/mL) y se fraccionó en una columna SPE C18 ("Solid Phase Extraction") (Baker®, 10 g), siguiendo las siguientes eluciones: metanol 100% (80 mL), agua (80 mL), muestra del cultivo (10 mL), ADE (80 mL), metanol 50% (80 mL) y metanol 100% (160 mL). La fracción 100% metanol se evaporó, ajustó a 50 mg/mL con metanol 100% y se empleó para análisis por cromatografía líquida (HPLC, Agilent 1200) en fase reversa empleando una columna Eclipse XDB C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm), una fase móvil A (agua grado HPLC + 0,1% TFA) y B (acetonitrilo + 0,1% TFA) con un flujo de 1 mL/min y con detección UV a 214 nm. El modo de operación fue en gradiente (30/100/100% de B en 0/25/35 min), inyectando 40 µL de la solución. Se determinó la presencia de las familias de LPs empleando un estándar de surfactina 98% (Sigma-Aldrich, S3523), y fengicinas e iturinas colectadas de un cultivo puro de *B. subtilis* 0015, un microorganismo productor de estos compuestos según protocolo y resultados obtenidos por Villegas, 2012; a los cuales se les determinó el tiempo de detección en el gradiente evaluado y se colectaron las fracciones. Entre 12-19 min se recolectó la fracción correspondiente a las fengicinas y entre 24- 33 min se colectó la correspondiente a las surfactinas. Estas fracciones se evaporaron a presión reducida (50°C, -50 psig), se resuspendieron en 2 mL de MeOH 100% y se evaporaron en el Eppendorf concentrator

Plus™ (Eppendorf, Harburg, Alemania) hasta obtener un sólido seco, el cual se pesó con el fin de realizar ajustes de concentración para su posterior análisis por LS-MS/MS.

Las fracciones purificadas por HPLC se analizaron por espectrometría de masas de alta resolución (Protein Facility de Iowa State University, Ames, IO, USA). Se empleó un HPLC (Agilent 1260) acoplado a un espectrómetro de masas en tándem Q-Exactive™ híbrido cuadrupole-orbitrap de Thermo Scientific, equipado con una fuente de ionización NanoSpray Flex y con ácido ciano-cinámico como matriz. Se emplearon los solventes A (Agua grado HPLC + 0,1% de ácido fórmico) y B (acetonitrilo con 0,1% ácido fórmico), se usó un gradiente de 20-100% en 13 min. Los datos fueron adquiridos en un rango entre 200 y 2000 m/z en modo de ionización positiva. Se realizó un análisis de MS/MS para los iones aductos de surfactinas y fengicinas, los cuales se fragmentaron posteriormente en una celda de colisión de iones HCD. La lista de iones resultantes del espectro fueron generados por medio del software Xcalibur (Thermo Scientific, version 2.2). Para el análisis de los resultados se empleó el software Proteowizard 3.0.10.200 (Chambers et al., 2012).

2.3.7 Evaluación de capacidad promotora de crecimiento de *B.subtilis* EA-CB0575 en tomate.

Se evaluó el potencial de promoción de crecimiento de *B.subtilis* EA-CB0575 y de dos cepas referencia reconocidas por su potencial PGPR: *B. amyloliquefaciens* FZB42 (Fan et al., 2012a), *B.subtilis* 168 (Itaya & Matsui, 1999) en tomate variedad Chonto-Santa Cruz a nivel de invernadero. Para ello se desinfectaron las semillas con etanol al 70% por 15 min e hipoclorito de sodio al 5% por 5 min, aplicando vacío (-100 KPa). Posteriormente se sometieron a 3 lavados con ADE y se estratificaron a 4°C por 24 h. La inoculación se realizó sumergiendo las semillas en una suspensión bacteriana a una concentración de 1×10^8 UFC/mL por 1 h. Las suspensiones bacterianas de *Bacillus* se realizaron inoculando una colonia de un cultivo de cada microorganismo en medio TSA X 0,5 en medio TSB por 24 h a 30°C y 150 rpm. Las células se recuperaron del cultivo por medio de una centrifugación a 3250 g por 15 min y se procedió a ajustar la concentración con ADE, según curvas de calibración previamente realizadas. Las semillas inoculadas se sembraron en macetas con 500 g de suelo comercial (arena, tierra negra y cizco de arroz 1:0,5:0,5) y se incubaron a nivel de invernadero a una temperatura entre 22 - 30 °C, fotoperiodo 12/12 h por 1 mes, empleando un diseño completamente al azar (DCA). Finalizado el tiempo de cultivo, se

determinaron las variables fisiológicas longitud aérea y radical (LA y LR) y pesos secos aéreos, radiculares y totales (PSA, PSR y PST). Se realizaron dos evaluaciones en tiempos diferentes cada una con 5 unidades experimentales por tratamiento. Cada unidad consistió en dos plantas por maceta.

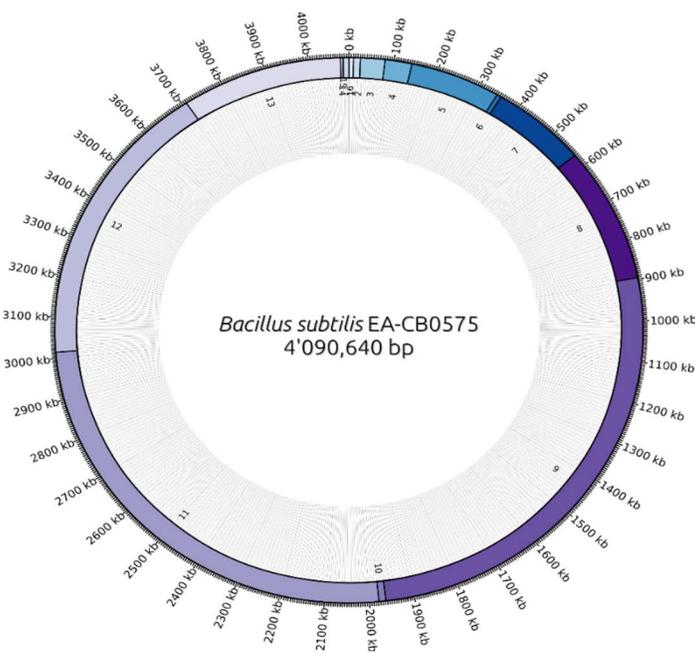
2.3.8 Análisis estadístico

Los datos obtenidos en los diferentes ensayos se analizaron estadísticamente por un análisis de varianza (ANOVA). Se verificaron los supuestos de normalidad (Test de Shapiro-Wilks), homocedasticidad (Test de Levene y Barlett) e independencia (gráfica residuos vs. Orden de corrida y estadístico de Durbin-Watson). Se empleó el test de rangos múltiples LSD, con el nivel de confianza enunciado en cada gráfica y/o tabla de resultados, y se realizó el Test de Duncan a la misma confianza con el fin de evaluar diferencias con el control sin aplicación de microorganismos, en el caso de las evaluaciones de promoción de crecimiento. Para las pruebas bioquímicas se empleó ADE con solución de Salkowsky, ADE con solución CAS, medio NFb sin inoculación y ADE con solución indicadora como control para los test de producción de AIA, sideróforos, fijación de nitrógeno y solubilización de fosfatos.

2.4 Resultados

2.4.1 El genoma *B.subtilis* EA-CB0575 posee genes que codifican la producción de compuestos implicados en mecanismos PGPR's.

Con el fin de conocer la taxonomía del microorganismo de estudio se realizó el secuenciación del gen 16s rRNA, determinando que pertenece a la especie *Bacillus subtilis* con un query cover de 100%, una identidad del 99% y un valor E de 0.0. Se realizó el ensamble del genoma completo de *B.subtilis* EA-CB0575 obteniendo 16 contigs, luego de un filtrado por calidad en el que se eliminó el 0,85% de las lecturas iniciales y alcanzando un tamaño medio de 255.665 pb. Para este ensamble se determinó un contenido promedio de G+C de 43,7% y un tamaño total del genoma de 4,09 Mb (Figura 2-1). La cobertura promedio del cluster fue de 110X y la mitad de las bases del genoma se encontraron en 2 contigs (N_{50}), el 90% en 6 (N_{90}) y el 95% en 7 contigs (N_{95}). La cobertura máxima del genoma fue de 2000X.

Figura 2-1. Diagrama de la distribución del genoma completo de *B. subtilis* EA-CB0575.

*Colores diferentes corresponden a cada uno de los contigs en los que el genoma resultó fraccionado.

A continuación se presenta la Tabla 2-2 con la anotación de genes implicados en procesos metabólicos y celulares de *Bacillus subtilis* EA-CB0575. Se observan los resultados por categorías de genes, existiendo una alta similitud entre la cantidad de genes en cada categoría entre *Bacillus* EA-CB0575 y la cepa tipo. Existe mayor cantidad de genes destinados al metabolismo del carbono y nitrógeno, cofactores, vitaminas, grupos prostéticos y pigmentos. Para los procesos celulares se determinó mayor cantidad de genes destinados a los procesos de formación de pared celular, cápsula y respuesta al estrés, incluyendo la dormancia y esporulación, que para otros procesos como la motilidad, la respiración, el transporte por membrana, entre otros. El genoma contiene 4332 genes, 4237 genes codificantes de proteínas, 95 genes de RNAs (entre ellos 10 copias del 16S rRNA), 2917 genes codificantes de proteínas con función predicha y 1320 genes codificantes de proteínas hipotéticas; mientras que para la cepa tipo se determinaron 4331 genes totales, 4114 genes codificantes de proteínas, 118 genes RNAs, 3028 genes codificantes de proteínas con funciones predichas y 1086 genes codificantes de proteínas hipotéticas.

Tabla 2-2. Anotación de genes implicados en el metabolismo y otros procesos celulares de *B.subtilis* EA-CB0575 y cepa referencia *B.subtilis* 168.

Genes implicados en metabolismo	<i>B.subtilis</i> EA-CB0575	<i>B.subtilis</i> 168
Ácidos grasos, lípidos e isoprenoides	119	102
Aminoácidos y derivados	428	432
Azufre	47	44
Carbohidratos	514	504
Cofactores, vitaminas, grupos prostéticos, pigmentos	218	265
Compuestos aromáticos	13	10
DNA	112	136
Fósforo	30	25
Hierro	28	32
Metabolismo secundario	4	6
Nitrógeno- Proteínas	242	269
Nucleósidos y nucleótidos	122	139
Potasio	15	26
RNA	163	194
Genes implicados en procesos celulares	<i>B.subtilis</i> EA-CB0575	<i>B.subtilis</i> 168
División y ciclo celular	55	48
Dormancia y esporulación	122	141
Formación de pared celular y cápsula	151	130
Fotosíntesis	0	0
Misceláneo	49	64
Motilidad y quimiotaxis	89	66
Regulación y señalización celular	61	50
Relacionados con fagos, profagos, elementos transponibles, plásmidos	13	0
Respiración	69	82
Respuesta al estrés	109	111
Transporte de membrana	73	75
Virulencia, enfermedad y defensa	71	77

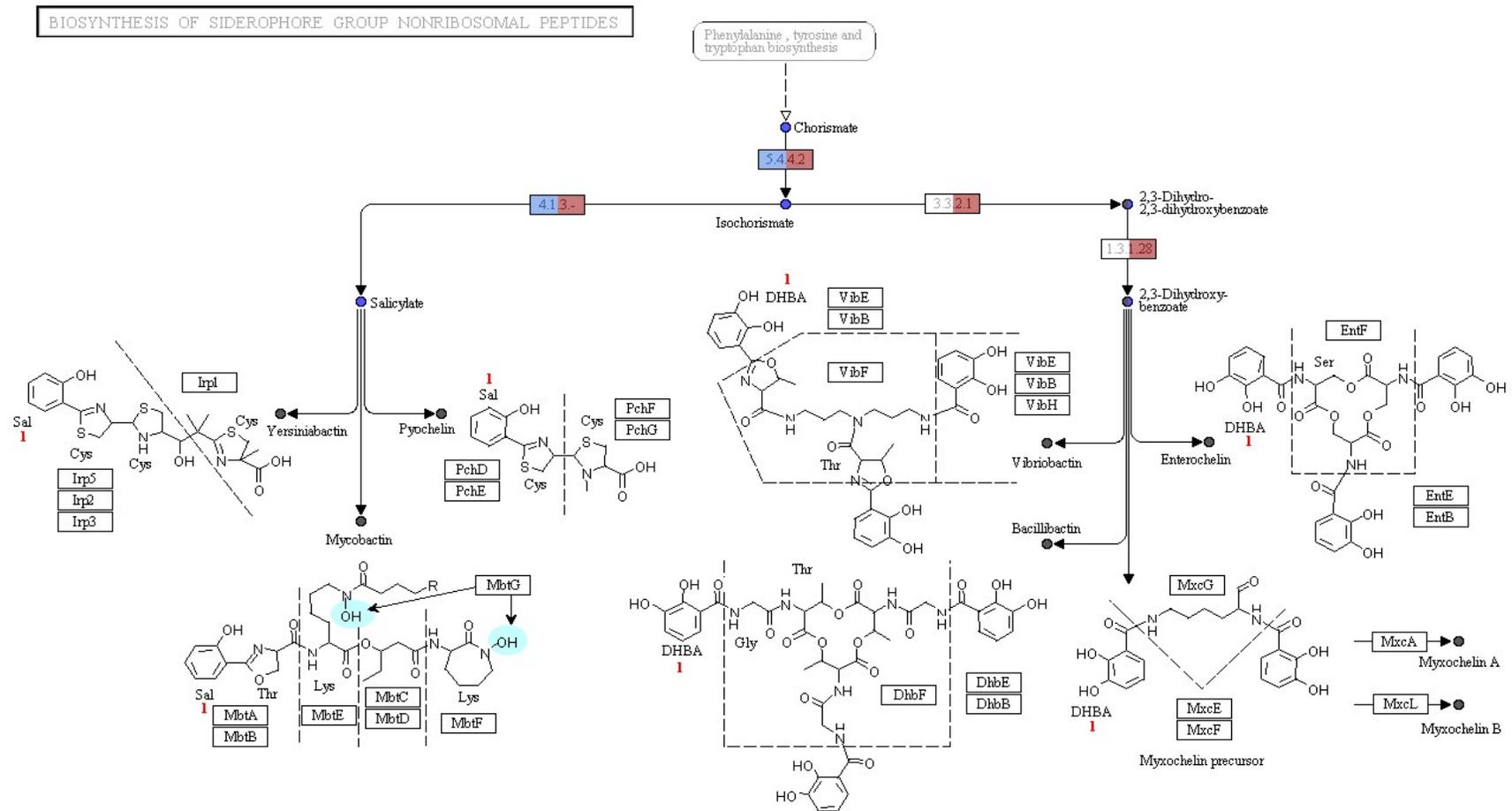
De la anotación de genes se determinó la presencia de genes relacionados con mecanismos PGPR o la predicción metabólica del RAST. Respecto a los indoles, específicamente AIA, se predijo la producción de algunas enzimas implicadas en su metabolismo por la vía del triptófano, sugiriendo que *B.subtilis* EA-CB0575 tiene la maquinaria para que la producción de estos compuestos. Se predijo la producción de indol, indol acetato e indol-acetamida (Figura 2-2). Se determinó también el potencial del microorganismo para la producción de sideróforos del tipo bacillibactina, enteroquelinas (enterobactinas), vibriobactinas y otros relacionados, sintetizados por NPRS's (Figura 2-3). Las enzimas relacionadas directamente con la producción de compuestos como salicilato, isocorismato y dihidroxibenzoato podrían ser producidas por *B.subtilis* EA-CB0575, para esto se requiere la presencia de genes que codifican para su producción. A partir de ahí, se podrían desencadenar rutas metabólicas que resulten en la producción de compuestos derivados, algunos sideróforos como la micobatina, pioquelina, bacilbactina, vibriobactina, entre otros. El cluster génico que codifica directamente para la producción de bacilbactina (*dhbACEBF*) se encontró en el genoma del microorganismo cuando se comparó respecto a las referencias (sección 2.3.5). Para la producción de compuestos volátiles como el 2,3-butanoldiol y acetoína (Figura 2-4), se predijo la producción de las enzimas α -acetolactato sintetasa, α -acetolactato decarboxilasa, acetoin-reductasa, acetilacetoin-sintasa, entre otras reportadas (Qi et al., 2014).

Se realizó la búsqueda de genes *phy*, que codifican para la producción de fitasas, uno de los mecanismos de solubilización de fosfatos, y se determinó que están presentes no sólo en *B.subtilis* EA-CB0575 sino también en la cepa referencia *B.subtilis* 168, indicando posible producción de fitasas. Finalmente se evaluó también la capacidad de fijación de nitrógeno ambiental por la cepa EA-CB0575 y se determinó la presencia de los genes *nifU*, *nifS*, *nifV* y *nifF*, los cuales son algunos de los genes involucrados en la formación de los clusters de la enzima nitrogenasa; encargada de la fijación biológica de nitrógeno. El genoma ensamblado y anotado se depositó en un servidor de la Universidad EAFIT operando bajo Ubuntu 14.04 y con acceso a través del *genome browser* GBrowse2 (Stein et al., 2002). Se realizó un análisis de los extremos de los contigs con el fin de determinar qué genes se encontraban en estas secciones, encontrando que el 50% de estos genes corresponden a rRNA, 26,67% a sintasas de péptidos no ribosomales, seguidos de 6,67% para tRNA's y los otros extremos corresponden a fagos y a proteínas GXT repetidas.

2.4.2 *B.subtilis* EA-CB0575 posee en su genoma las regiones codificantes para la producción de NRPS's de LPs.

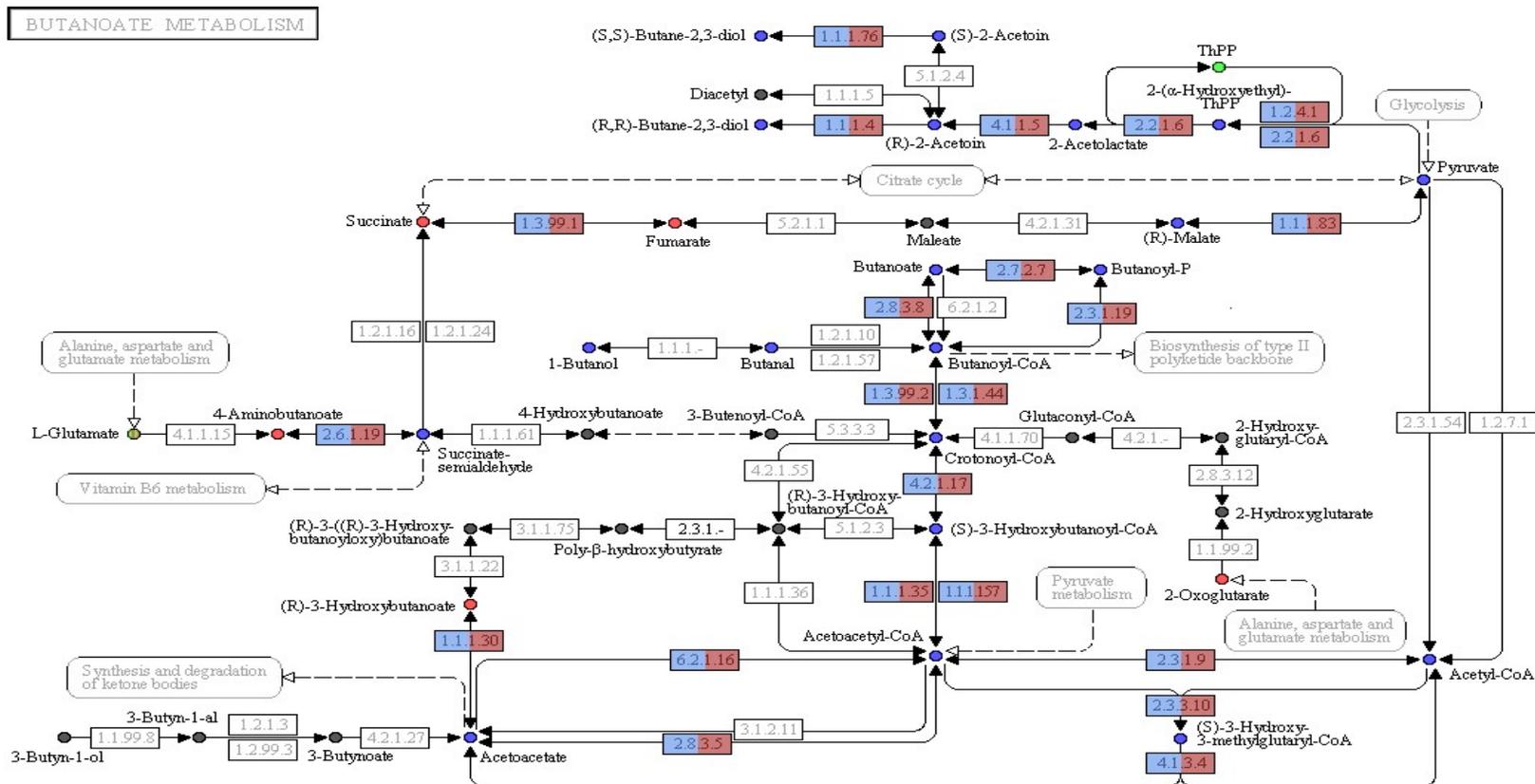
Se evaluó la presencia de secuencias codificantes de NRPS involucradas en la síntesis de surfactinas, fengicinas e iturinas en el genoma de *B.subtilis* EA-CB0575 usando como referencia *B. amyloliquefaciens* FZB42. Para *B.subtilis* EA-CB0575 se encontraron regiones codificantes para la producción de surfactinas y fengicinas, pero no para iturinas. Las regiones codificantes para NRPS's que producen surfactinas se encuentran en los clusters 5, 6 y 7 y las de fengicinas en los clusters 9, 10 y 11. Se realizó la comparación de los loci presentes en *B.subtilis* EA-CB0575 respecto a las referencias *B. amyloliquefaciens* FZB42 y *B.subtilis* 168. Para *B.subtilis* EA-CB0575 se reconstruyeron 4 ORFs reportados para el operón de la surfactina, con dos gaps de unos pocos nucleótidos entre los clusters de ensamble 5 y 6, y 6 y 7, en los genes *srfAA* y *srfAC*. De las secuencias de aminoácidos de estos ORFs se obtuvieron 7 dominios de adenilación y uno tioesterasa/aciltransferasa. Para la fengicina se obtuvieron 3 de los 5 ORFs del operón, correspondientes a los genes *fenA*, *fenC* y *fenE*. Se obtuvieron dos dominios de adenilación para el primero, dos para el segundo y uno de adenilación y uno tioesterasa para el tercero. Para las cepas referencia, se encontró la región que codifica para las sintasas relacionadas con la producción de surfactinas y fengicinas, sin embargo, no se encontró la región de producción de iturinas en la 168 pero sí en la cepa FZB42.

Figura 2-3. Predicción del metabolismo de sideróforos y sus derivados por medio de RAST para *B.subtilis* EA-CB0575 y la cepa tipo.



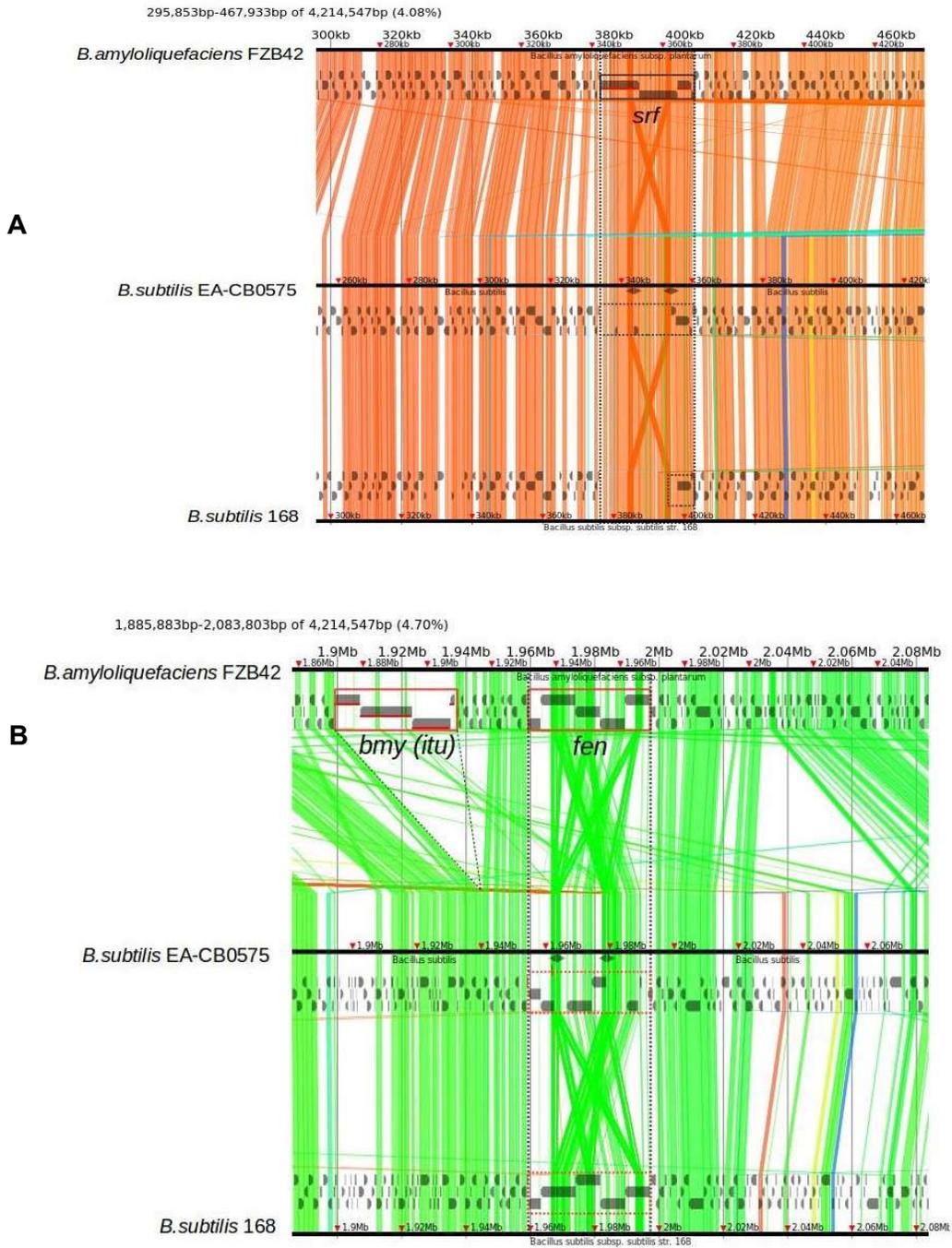
En cuadros azules se observan las enzimas relacionadas con el metabolismo de sideróforos, en círculos azules se presentan los metabolitos que podrían generarse por la cepa *B. subtilis* EA-CB057 y en rectángulos en rojo se presentan los metabolitos que podrían producirse por la cepa tipo *B. subtilis* 168.

Figura 2-4. Predicción del metabolismo de compuestos volátiles 2,3 butanodiol y la acetoina y sus derivados por medio de RAST para *B. subtilis* EA-CB0575 y para la cepa tiop.



En cuadros azules se observan las enzimas relacionadas con el metabolismo de 2,3 butanodiol y acetoina que podrían producirse por *B. subtilis* EA-CB0575, en círculos azules, los metabolitos que podría producir esta cepa. En cuadros rojos las enzimas que podrían generar *B. subtilis* 168, los círculos rojos son los metabolitos que podría generar esta cepa.

Figura 2-5. Determinación de los loci para la producción de las NRPS's de surfactinas, fengicinas e iturinas en los genomas de *B. amyloliquefaciens* FZB42, *B. subtilis* EA-CB0575 y *B. subtilis* 168.



A: Diagrama de ubicación de los loci responsables de la síntesis de las NRPS de surfactina en la cepa *B. subtilis* EA-CB0575 en contraste con las cepas referencia *B. subtilis* 168 y *B. amyloliquefaciens* FZB42 B: Diagrama de ubicación de los loci para genes implicados en la producción de la iturina Bacillomycinina y de fengicina B en la cepa *B. subtilis* EA-CB0575 en contraste con las cepas referencia *B. subtilis* 168 y *B. amyloliquefaciens* FZB42.

2.4.3 La cepa *B.subtilis* EA-CB0575 posee un 3,9% de su genoma dedicado a la producción de metabolitos secundarios

Se realizó la genómica comparativa de *B.subtilis* EA-CB0575 con las dos cepas referencia, *B.subtilis* 168 y *B. amyloliquefaciens* FZB42 en cuanto al tamaño del genoma y al potencial para la producción de algunos metabolitos secundarios (Tabla 2-3). Se observa similitud en los tamaños del genoma y algunos de los genes presentes. Existe mayor semejanza entre el porcentaje del genoma dedicado a producción de metabolitos secundarios en *B.subtilis* que *B. amyloliquefaciens*, siendo esta última especie la de mayor porcentaje del genoma dedicado a la producción de estos compuestos (8,02%). Algunos clusters génicos de importancia como los relacionados a la producción de antibióticos, del sideróforo bacilibactina y de algunos LPs, se comparten entre las especies evaluadas.

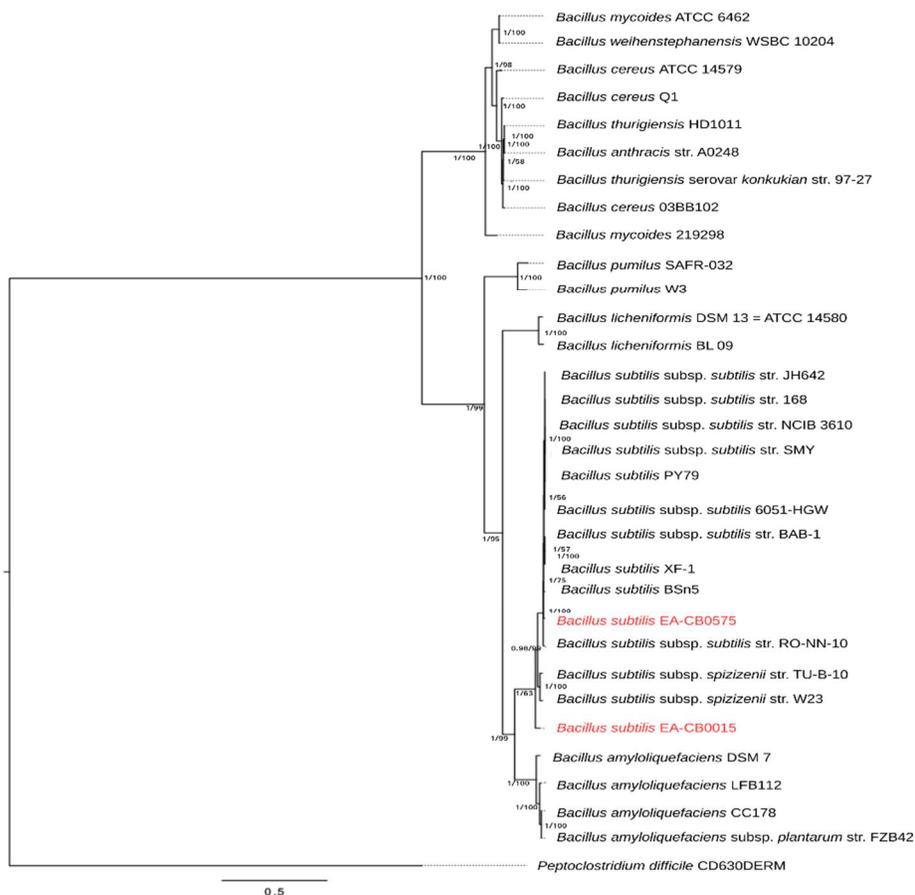
Tabla 2-3. Genómica comparativa de *B.subtilis* EA-CB0575 con las cepas de referencia.

Compuesto	Compuesto	Tipo	# de Genes	Genes	Gen (kpb)	<i>B. subtilis</i> EA-CB0575	<i>B. subtilis</i> 168	<i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42
Bacilibactina	Sideróforo	NRPS	5	<i>dhbACEBF</i>	11,7	✓	✓	✓
Iturina/ Bacilomycina	LP	NRPS/PKS	4	<i>bmyDABC</i>	37,2	----	----	✓
Fengicina		NRPS	5	<i>fenABCDE</i>	37,6	✓	✓	✓
Surfactina		NRPS	4	<i>srfABCD</i>	26,2	✓	----	✓
Bacilycina	Antibiótico	NRPS	5	<i>bacABCDE</i>	4,7	✓	✓	✓
Macrolactina		PKS	9	<i>mlnABCDEFGH</i>	53,9	----	----	✓
Bacillaeno		PKS	14	<i>baeBCDEGHILMNRS, acpK</i>	72,4	✓	✓	✓
Difficidina		PKS	15	<i>dfnAYXBCDEFGHIJKLM</i>	70	----	----	✓
Subtilosina		Sactipéptido	8	n/d	6,9	✓	✓	----
Genoma dedicado a producción de metabolitos Secundarios (%)						3,90	3,79	8,02
Longitud del genoma (Mpb)						4,09	4,21	3,91

2.4.4 *B.subtilis* EA-CB0575 pertenece al clado de *B.subtilis* subs. *subtilis*

La relación filogenética de *B.subtilis* EA-CB0575 con otras cepas *Bacillus* sp. se realizó comparando un set de genes housekeeping (Figura 2-6). El mejor esquema de particionado del alineamiento de los genes concatenados estuvo compuesto por 6 subsets, con las 15 particiones preliminares dadas es decir, una por cada posición de codones (1, 2, 3) en cada uno de los 5 genes analizados. Se observan dos grandes clados: El primero conteniendo a *B. thurigiensis*, *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. mycoides* y *B. weihenstephanensis*, los cuales son *Bacillus* spp. patógenos de diversos hospederos. El segundo clado está compuesto por *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *B.subtilis* y *B. amyloliquefaciens*.

Figura 2-6. Filogenia de *Bacillus* spp. a partir de genes *housekeeping* (*rpoB*, *gyrA*, *purH*, *polC* y *groEL*) obtenida por los métodos de inferencia bayesiana y máxima verosimilitud.



Se muestran para los nodos internos los valores de soporte: probabilidad posterior (PP) para BI y el porcentaje de bootstrap (BP) para ML. Las cepas de estudio se encuentran resaltadas en rojo.

2.4.5 Producción de índoles, sideróforos, LPs, capacidad de solubilización de fosfatos y fijación de nitrógeno: características PGPR de *B.subtilis* EA-CB0575

Con el fin de conocer los posibles mecanismos PGPR de la cepa de estudio se realizaron evaluaciones bioquímicas para determinar el potencial de producción de índoles, sideróforos, la capacidad de solubilizar fosfatos y el potencial para fijar nitrógeno atmosférico. Se determinó que el microorganismo *B.subtilis* EA-CB0575 posee el potencial para todos los rasgos evaluados (Tabla 2-4).

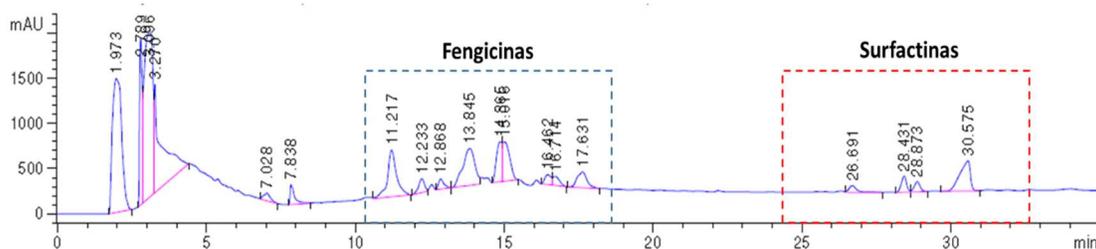
Tabla 2-4. Rasgos bioquímicos PGPR a nivel *in vitro* de diferentes cepas de *Bacillus* EA-CB0575 y cepas de referencia *Bacillus* sp.

Microorganismo	AIA (µg/mL)	Sideróforos(µM)	Solubilización de fosfatos (mg/L)	Fijación de nitrógeno*
<i>B.subtilis</i> EA-CB0575	15,0 ± 2,0 a	15,4 ± 1,1 a	0,1 ± 0,0 a	+
<i>B.subtilis</i> 168	6,9 ± 1,4 b	7,6 ± 0,9 b	0,0 ± 0,0 b	-
<i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42	17,7 ± 1,7 a	9,8 ± 0,3 b	0,1 ± 0,0 a	-

Letras diferentes denotan diferencias significativas ($p < 0.05$) según rangos múltiples de LSD.* +: denota crecimiento en medio NFb indicativo de posible fijación de nitrógeno. -: denota ausencia de crecimiento en medio NFb.

Se determinó que *B. subtilis* EA-CB0575 produce índoles totales (15 µg/mL), sideróforos (15,4 µM), puede solubilizar fosfatos en un medio con roca fosfórica como única fuente de fósforo y podría fijar nitrógeno ambiental. La cepa *B.subtilis* 168 produce AIA en menor proporción que *B.subtilis* EA-CB0575 (2,17 veces menos), además puede producir sideróforos, pero no tiene potencial de fijación de nitrógeno ni de solubilizar fosfatos. La cepa *B. amyloliquefaciens* FZB42 produce AIA sin diferencias significativas con la EA-CB0575, es productora de sideróforos y tiene potencial de solubilización de roca fosfórica, pero no tiene potencial de fijación de nitrógeno a nivel *in vitro*. Complementario a estas evaluaciones, se determinó la capacidad de producción de LPs por parte de *B.subtilis* EA-CB0575. Se presenta el perfil cromatográfico obtenido para el extracto SPE 100% Metanol en medio MOLP (Figura 2-7). Se observan los picos característicos de fengicinas (min 12 al 19) y de surfactinas (del min 24 al 33) (Villegas-Escobar, 2012). No se observan picos referencia de la producción de iturinas, los cuales deberían encontrarse entre el min 8 al 11 siguiendo el mismo gradiente y condiciones de trabajo.

Figura 2-7. Cromatograma de HPLC para extracto SPE-100% metanol del cultivo de *B.subtilis* EA-CB0575 en medio MOLP.

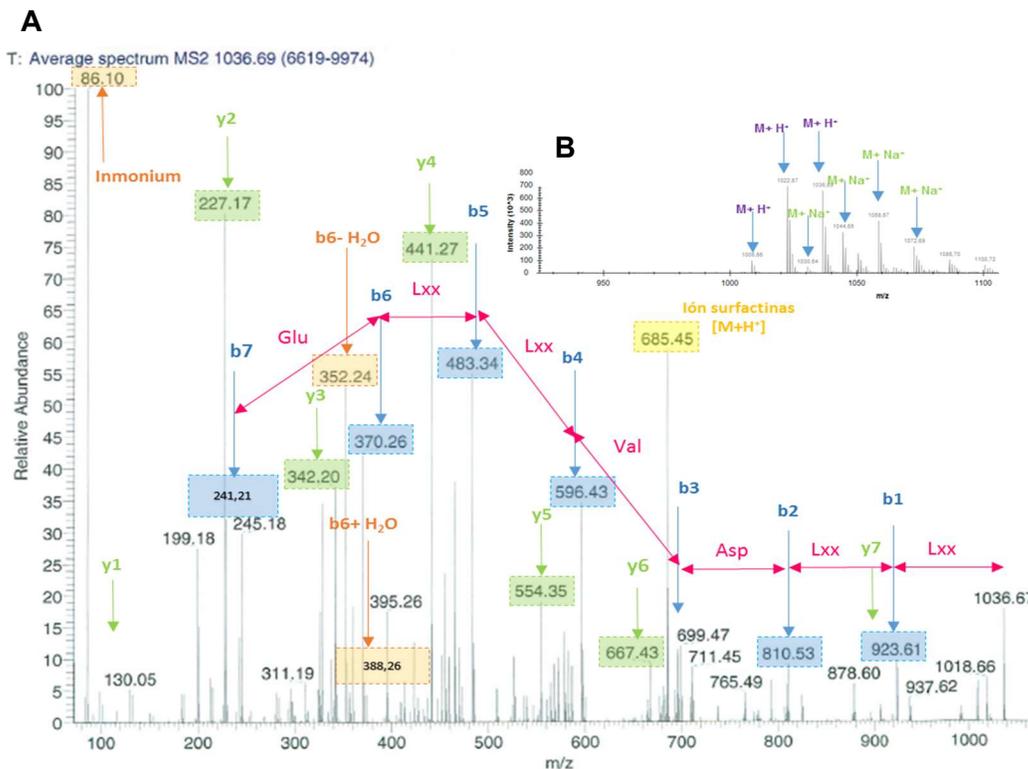


Condiciones de operación del HPLC: λ 214 nm, 40 μ L de inyección (concentración 10 mg/mL), flujo 1 mL/min, 30°C, columna eclipse XDB C18 250 x 4,6 mm 5 μ m, A: agua HPLC + 0,1% TFA, B: CH₃CN + 0.1% TFA. Gradiente 30/100/100% B en 0/25/35 min.

Se realizaron evaluaciones de espectrometría de masas para las fracciones purificadas de surfactinas y fengicinas, con el fin de determinar la presencia de los iones precursores de estas familias de LPs y los iones resultantes de la fragmentación de la molécula por MS/MS. Se presentan los espectros MS y MS/MS para la fracción purificada de surfactinas (Figura 2-8). Se observan los iones precursores característicos de surfactinas a m/z 1008,66; 1022,67; 1036,69; 1030,64; 1044,66; 1058,67 y 1072,69; de los cuales, los tres primeros corresponden a moléculas protonadas $[M+H]^+$ y los cuatros siguientes a aductos de sodio $[M+Na]^+$. La diferencia de peso entre los tipos de aductos es de 14 Da, sugiriendo una diferencia de un grupo CH₂ entre las moléculas. En el espectro MS/MS para el ion precursor a m/z 1036,69 el cual se presenta como ejemplo, se detectaron principalmente dos series de productos iónicos derivados de la apertura del anillo lactona, iones “b” y “y”. Los iones b (azul) están representados por fragmentos iónicos a m/z 923,61→810,53→596,43→483,34→370,26→241,41 interpretados como la pérdida de Lxx₇-Lxx₆-(D₅-V₄)-Lxx₃-Lxx₂-E₁ de la región N terminal. Los iones y (verde) están representados por fragmentos iónicos a m/z 667,43→554,35→441,27→342,27→227,17 correspondientes a la pérdida de AG_n-E₁-Lxx₂-Lxx₃-V₄-D₅ de la región C terminal. La unión de las dos series indica que la estructura de la molécula es AG_n-E₁-Lxx₂-Lxx₃-V₄-D₅-Lxx₆-Lxx₇ correspondiente a la C15 surfactina. Adicionalmente se detectaron iones b ± H₂O e inmonium (naranja), y el ión característico de surfactinas m/z 685,45 el cual corresponde a un fragmento protonado interno de las surfactinas con estructura $[(H) Lxx_2-Lxx_3-V_4-D_5-Lxx_6-Lxx_7(OH)+H]^+$ (Hue et al., 2001). En el Anexo II se presentan los iones precursores y productos iónicos resultantes del fraccionamiento de todos los homólogos de surfactinas por medio de MS/MS, concluyendo

que *B. subtilis* EA-CB0575 produce las surfactinas C12, C13, C14, C15 y C16 en medio de cultivo MOLP.

Figura 2-8. Espectros MS y MS/MS de las surfactinas producidas por *B. subtilis* EA-CB0575 en medio MOLP

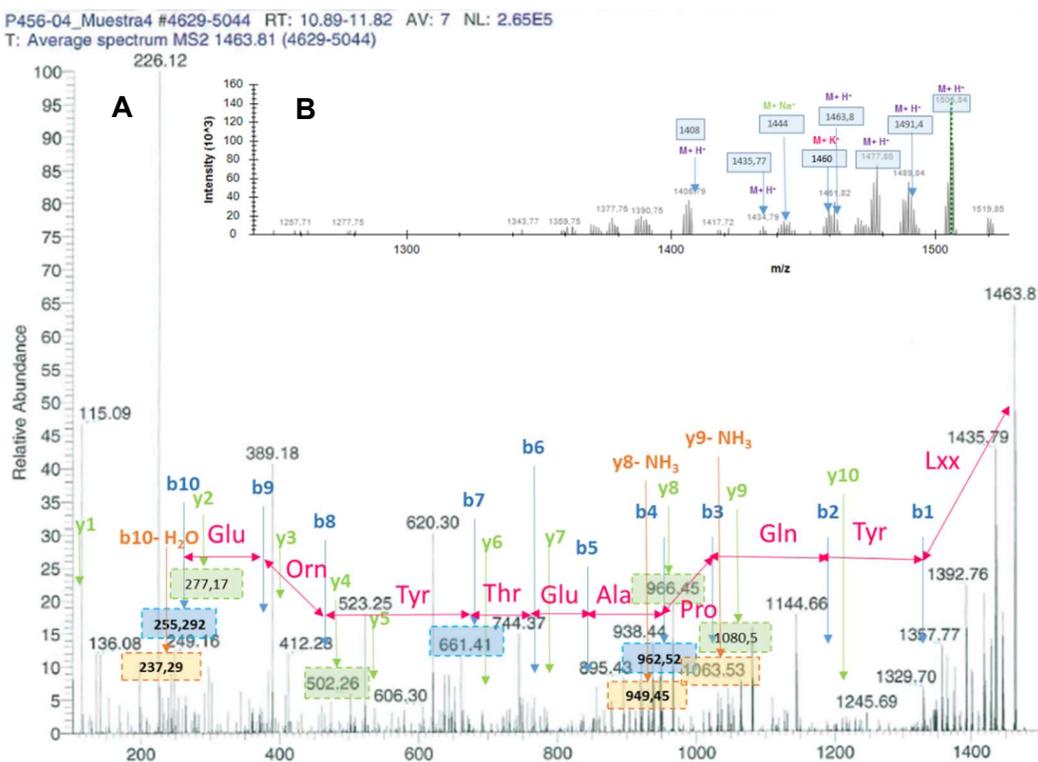


A: Espectro MS/MS para el ión precursor 1036,69 ($M+H^+$). **B:** Espectro MS para las surfactinas purificadas por HPLC del sobrenadante del cultivo de *B. subtilis* EA-CB0575 en medio MOLP. En cuadros se presentan los iones b encontrados en este fraccionamiento, en verde los iones y y en naranja los iones $b\pm H_2O$.

Para el grupo de picos colectados entre los 12-19 min se realizó un análisis MS y MS/MS. Se determinaron los iones precursores m/z 1408; 1435,77; 1444; 1460; 1463,81; 1477,82; 1491,83 y 1505,85 correspondientes en su mayoría a moléculas protonadas $[M+H]^+$, y tan sólo el aducto de $[M+Na^+]$ con m/z 1444 y el $[M+K^+]$ a m/z 1460. Estos aductos son típicos de fengicinas A y B, y sus pesos moleculares son concordantes a estas moléculas (Villegas-Escobar, 2012). Se realizó un análisis MS/MS a todos los iones enunciados y los resultados de todos los fraccionamientos se presentan en el Anexo II. En la Figura 2-9 se presenta el MS/MS para el ion precursor m/z 1463,83. El fraccionamiento de este ión precursor arrojó los productos iónicos a m/z 1080,50 y 966,45, reportados para el fraccionamiento de la fengicina A (Wang et al., 2004). Estos productos iónicos se encontraron en el fraccionamiento de los iones 1435,7; 1449,79; 1463,81 y 1477,82; y explican la pérdida de

AG_n-Glu y AG_n-Glu-Orn de la región N terminal del segmento de la C14, C15, C16 y C17 fengicina A respectivamente. Mientras que de los iones precursores m/z 1491,83 y 1505,85 se determinaron los productos iónicos a m/z 1108,58 y 994,49, que se explica como la pérdida del (AG_n-Glu) y (AG_n-Glu-Orn) de la región N terminal de la C16 y C17 fengicina B. Al analizar los MS/MS y los pesos moleculares de las fengicinas con cadena apolar C16 y C17, se determinó una diferencia de 28 Da entre los iones, debida posiblemente al reemplazo de una alanina (Ala) por valina (V) en la cadena de aminoácidos. De esta manera, los iones precursores 1463,81 y 1477,82 corresponden a fengicina A, con productos iónicos característicos a m/z 1108,58 y 994,49; y los iones precursores con m/z 1491,83 y 1505,85 podrían corresponder a fengicina B con los productos iónicos con m/z 1108,58 y 994,49.

Figura 2-9. Espectros MS y MS/MS de las fengicinas producidas por *B.subtilis* EA-CB0575 en medio MOLP



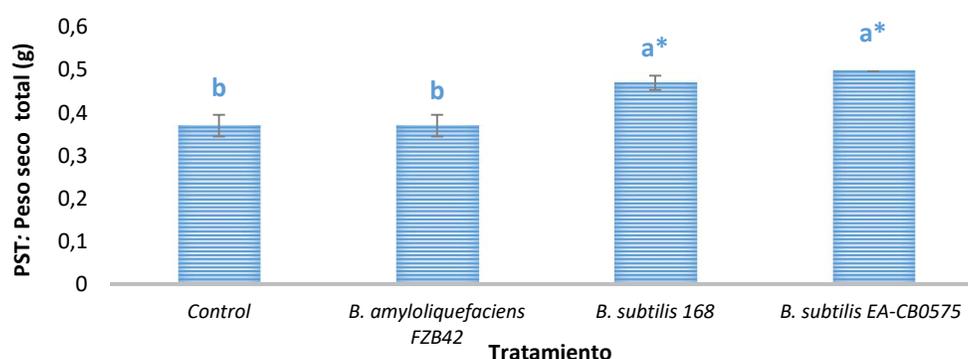
A: Espectro MS/MS para el ión precursor 1463,83 (M+ H⁺). **B:** Espectro MS para las fengicinas purificadas por HPLC del sobrenadante del cultivo de *B.subtilis* EA-CB0575 en medio MOLP. En cuadros se presentan los iones b encontrados en este fraccionamiento, en verde los iones y y en naranja los iones b±H₂O ó y-NH₃.

En la Figura 2-9, se presenta el espectro MS/MS del ión con m/z 1463,81 y en el Anexo II se encuentran todos los productos iónicos de la fragmentación de los demás iones precursores de las fengicinas. Para este precursor se encontraron iones “b”, los iones “y” previamente enunciados y otros iones con pérdidas de NH_3 o H_2O . La secuencia de iones “y” encontrados fue $1463,8 \rightarrow 1080,5 \rightarrow 966,45 \rightarrow 502,26 \rightarrow 277,17$; correspondientes a la pérdida de $(\text{AG}_n + \text{Glu}_1) - \text{Orn}_2 - (\text{Tyr}_3 + \text{Thr}_4 + \text{Glu}_5 + \text{Ala}_6) - (\text{Pro}_7 + \text{Gln}_8)$ respectivamente. La serie de iones b encontrada contiene los iones a $1463,81 \rightarrow 962,52 \rightarrow 661,41 \rightarrow 255,12$ equivalente a la pérdida de $(\text{Lxx}_{10} + \text{Tyr}_9 + \text{Gln}_8 + \text{Pro}_7) - (\text{Ala}_6 - \text{Glu}_5 + \text{Thr}_4) - (\text{Tyr}_3 + \text{Orn}_2 + \text{Glu}_1)$ de la región N terminal respectivamente. Sin embargo, las secciones de 3 ó 4 aminoácidos secuenciales unidos podrían interpretarse en diferentes órdenes, por lo que se recomienda hidrolizar el anillo lactona y realizar nuevamente el análisis, con el fin de verificar la secuencia. Al unir las secuencias se obtiene la estructura que podría ser $\text{AG-Glu}_1 - \text{Orn}_2 - \text{Tyr}_3 - \text{Thr}_4 - \text{Glu}_5 - \text{Ala}_6 - \text{Pro}_7 - \text{Gln}_8 - \text{Tyr}_9 - \text{Lxx}_{10}$, correspondiente a la secuencia de C16 fengicina A.

2.4.6 La especie *B.subtilis* es potencial PGPR en plantas de tomate

Se aplicó el microorganismo *B. subtilis* EA-CB0575 en forma de esporas o células vegetativas y las cepas referencia *B. subtilis* 168 y *B. amyloliquefaciens* FZB42 en forma de células vegetativas a semillas de tomate.

Figura 2-10. Efecto de la aplicación de *B. subtilis* EA-CB0575 y cepas de referencia en la promoción de crecimiento de tomate a nivel de invernadero en sustrato comercial.



Los datos son los promedios de 2 evaluaciones en tiempos independientes cada uno con $n=5$ por tratamiento. Letras diferentes corresponden a tratamientos con diferencias significativas de acuerdo al test LSD (Valor-P= 0,0017). Los asteriscos corresponden a los tratamientos con diferencias significativas con el control agua por el test de Dunnett, ambos con 95% de confianza (Valor-P Dunnett *B. subtilis* 168: 0,025; *B. subtilis* EA-CB0575: 0,004).

Se determinó aumento medio de 29% en el PST de las plantas con aplicación de *B. subtilis* respecto al control, siendo mayor la media de aumento para *B. subtilis* EA-CB0575 con un 34,6%. La cepa *B. amyloliquefaciens* FZB42 no presentó aumento en la variable respecto al control sin aplicación del microorganismo.

2.5 Discusión

Los resultados del ensamble del genoma de *B. subtilis* EA-CB0575 son similares a los revelados en otros genomas de cepas de la especie (Guo et al., 2015; Liu et al., 2016; Zhao et al., 2015). El genoma presentó quiebres en las secciones correspondientes a genes que codifican rRNA, tRNAs, sintasas de péptidos no ribosomales, inserciones de fagos y transposasas, lo cual podría deberse a la dificultad que representa para el ensamblador trabajar con secuencias que se repiten (Nederbragt et al., 2010), ya que el algoritmo de grafos no resuelve las copias por separado (Compeau et al., 2011). Además, regiones con estructura modular conservada a nivel de secuencia, como el caso de las NRPSs, aparecen como otro punto de corte del ensamble explicado por la ambigüedad en los extremos que no se resuelve computacionalmente con la información disponible. La fragmentación del genoma obtenida (16 contigs, con longitud media de 255,665 pb), se considera buena para los análisis genómicos derivados. Al comparar este número de contigs con el obtenido en otros proyectos similares, se observa menor división en nuestro caso (205 particiones para la cepa tipo, *B. natto* BEST195 con 390) que para otros *B. subtilis* (Kunst et al., 1997; Nishito et al., 2010; Ruckert et al., 2011; Ulyanova et al., 2016). Al anotar los genes involucrados en mecanismos PGPR y realizar las predicciones metabólicas, se determinó que en el genoma hay genes relacionados a la producción de enzimas involucradas en la ruta metabólica de triptófano a índoles, lo cual es congruente con la producción de índoles totales determinada a nivel *in vitro* (15 µg/mL), concentración cercana a la de PGPR's reportadas y no considerada deletérea para la planta (Barazani & Friedman, 1999). Se evaluó la predicción metabólica para sideróforos, encontrando que estos podrían producirse por la maquinaria metabólica presente, lo que se corroboró bioquímicamente con una producción de 15,4 µM. Estos compuestos brindan a la planta y al microorganismo posibilidades para mejorar la asimilación del hierro y son elicitores de resistencia sistémica en la planta (Aznar & Dellagi, 2015). Se determinó la presencia de *nifU*, *nifS*, *nifV* y *nifF*, todos esenciales para codificar los componentes de los módulos enzimáticos de la nitrogenasa (Johnson et al., 2005; Li et al., 2016). Su presencia sugiere la posibilidad de

encontrar otros genes componentes de estos dominios en el genoma, los cuales se relacionan con la habilidad del microorganismo para fijar nitrógeno ambiental, determinado experimentalmente por el crecimiento de *B.subtilis* EA-CB0575 en el medio NFb. Sin embargo, se hace necesario la evaluación de la fijación por métodos de mayor rigor como el método de reducción de acetileno a etileno (Park et al., 2005). Se estableció la presencia de genes *phyC*, que codifican para la producción de fitasas en *B.subtilis* EA-CB0575, y hay reportes de su presencia en *B.subtilis* 168 (Idriss et al., 2002). Esto se corroboró en las evaluaciones bioquímicas para la cepa EA-CB0575, la cual pudo crecer en medio con roca fosfórica y arrojó resultados positivos en la prueba del azul de molibdato. La cepa tipo no creció en el medio, ni arrojó resultados positivos en el test enunciado; indicando que posiblemente los genes *phyC* no se expresan, a pesar de estar presentes en el genoma. Adicionalmente se encontró que *B.subtilis* EA-CB0575 posee la maquinaria para producción de 2,3-butanodiol y acetoína, pero esto no se corroboró a nivel *in vitro*.

Se realizó la caracterización de las regiones que codifican para las NPRS's del tipo LPs, empleando las cepas *B. amyloliquefaciens* FZB42 y *B.subtilis* 168 como referencia. Se determinó que en el genoma de *B.subtilis* EA-CB0575 existen regiones homólogas a las que codifican para las NRPS's de surfactinas y fengicinas. No se encontraron las regiones codificantes para producción de iturinas, coherente con lo determinado experimentalmente (Villegas-Escobar, 2012). Se evaluó la producción de estos LPs en medio MOLP empleando HPLC y espectrometría de masas, determinando la producción de surfactinas C12 a C16; además de fengicinas A (C14, C15, C16, C17) y B (C16 y C17). Para las cepas referencia también se determinó la presencia de los loci para producción de surfactinas y fengicinas pero no se hizo la evaluación *in vitro*. Diferentes reportes indican que estos compuestos no son detectados en los cultivos *in vitro* de la cepa *B.subtilis* 168 debido a una mutación en el gen *sfp*, lo cual afecta la producción de surfactinas (Chen et al., 2007). Para la cepa FZB42 se encontró el loci que codifica la producción de NRPS's de iturinas; y a nivel experimental se ha determinado la producción *in vitro* de las tres familias de LPs (Koumoutsi et al., 2004).

B.subtilis EA-CB0575 presenta mayor cantidad de elementos insertados en el genoma que las referencias, posiblemente por su carácter silvestre y la domesticación de la cepa referencia 168 (Veening et al., 2006). Además, 3,9% de su genoma está asociado al metabolismo secundario. Sin embargo, su potencial no sólo está relacionado con el número de genes involucrados, sino también con los niveles de expresión de estos genes; y para

conocerlo se requerirían análisis transcriptómicos. En este mismo proceso se determinó que muchos de los clusters génicos que se presentan en la cepa referencia, *B. amyloliquefaciens* FZB42, principio activo de Biomex® y Rhizovital®42, están también presentes en la cepa *B. subtilis* EA-CB0575; lo que hace a esta cepa promisoría para el desarrollo de bioinsumos. Las topologías de los árboles filogenéticos obtenidos fueron coincidentes y con altos valores de soporte en la mayoría de las ramas (BP:> 75, PP: > 0.95). Se determinó que la resolución que ofrecen los árboles basados en el gen 16S no es suficiente para diferenciar las cepas en el grupo *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* y *B. licheniformis*, probablemente por la alta similitud en las secuencias del gen (Rooney et al., 2009). Se encontraron dos clados: uno en el que se encuentran *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. mycoides* y *B. weihenstephanensis*, grupo con *Bacillus spp.* patógenos de diversos hospederos y un segundo clado formado por *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens*, todos presentes en suelo. *B. amyloliquefaciens* y *B. subtilis* se diferencian en clados hermanos bien resueltos, independientes de *B. licheniformis*, lo que no sucedía con claridad en la filogenia inferida sólo con información del gen ribosomal 16S (Anexo III).

En la evaluación de promoción de crecimiento en planta se determinó el potencial PGPR de *B. subtilis* EA-CB0575 y la cepa tipo *B. subtilis* 168 en plantas de tomate. Se encontró un mejor desempeño de los microorganismos de la especie *B. subtilis* que *B. amyloliquefaciens* para promover el PST de la planta, con porcentajes de aumento respecto al control entre 25,4 y 34,6%, respectivamente. La cepa *B. amyloliquefaciens* no presentó diferencias con el control, sin embargo, esta cepa ha sido reportada como promotora de crecimiento por medio de mecanismos indirectos de promoción como el biocontrol (Chowdhury et al., 2015).

2.6 Conclusión

B. subtilis EA-CB0575 es potencial PGPR debido a su capacidad genómica y fenotípica relacionada con los mecanismos de promoción de crecimiento vegetal. Su genoma fue ensamblado en este proyecto en 16 contigs, y se realizaron análisis de los genes presentes en su genoma relacionados con los mecanismos de promoción de crecimiento vegetal, encontrando genes relacionados a la producción de AIA, sideróforos, fijación de nitrógeno, solubilización de fosfatos, producción de LPs y de acetoina y 2,3 butanodiol. Los análisis bioquímicos permitieron determinar la posibilidad del microorganismo para

producción de LPs de las familias de las surfactinas (surfactinas C12, C13, C14, C15 y C16), fengicinas A (C14, C15, C16, C17) y fengicinas B (C16 y C17) y corroborar su posibilidad para la producción de índoles totales, sideróforos, para solubilizar fosfatos y fijar nitrógeno ambiental. Se determinó que el microorganismo tiene un 3,9% de su genoma dedicado a la producción de metabolitos secundarios y que filogenéticamente pertenece al clado de *B. subtilis subtilis*. Además se evaluó la promoción de crecimiento en tomate inoculando desde semilla y sembrando a nivel de invernadero, promoviendo el PST de la planta al aplicar las células vegetativas de las cepas EA-CB0575 y 168, ambas *B.subtilis*.

3. Promoción de crecimiento en banano y tomate por la aplicación de *Bacillus subtilis* EA-CB0575.

3.1 Resumen

El uso de microorganismos PGPR es una alternativa para el crecimiento de los cultivos. En este capítulo se describe la evaluación del potencial PGPR de *B. subtilis* EA-CB0575 en tomate y banano desde etapas tempranas de desarrollo. Se usaron dos concentraciones de *B. subtilis* (1×10^7 y 1×10^8 UFC/mL), dos estructuras microbianas (esporas ó células vegetativas) y el material vegetal se sembró en diferentes sustratos. Se encontró que el microorganismo promueve el crecimiento en las dos especies vegetales, con resultados positivos en ambas concentraciones y estructuras celulares. Los porcentajes de aumento y las variables con respuesta exitosa pueden variar en los diferentes experimentos, pero el aumento del peso seco total (PST) fue consistente entre ensayos. En tomate se encontró un aumento del índice de vigor y porcentaje de germinación de las semillas y un mayor PST de las plantas inoculadas en medio Murashige-Skoog sólido ($MS_{(s)}$), con porcentajes de aumento globales entre 17,4% - 30,6%. En $MS_{(L)}$ se determinaron aumentos de longitud aérea (LA) y PST entre 10,7% - 69,3% respectivamente; y en sustrato suelo se encontró que las células vegetativas a 1×10^8 UFC/mL aumentan el PST; con aumentos entre 82,4% y 104,6% en dos suelos evaluados, uno con alta y otro con baja cantidad de materia orgánica. En banano, la inoculación promueve el crecimiento en invernadero a los 120 DDI (días después de inoculación) con aumentos medios del 11% en PST. A nivel *in vitro* hubo diferencias a los 30 DDI en medio $MS_{(L)}$, en el PFT. Se determinó que la aplicación del microorganismo desde etapa *in vitro* (en medio $MS_{(s)}$ y $MS_{(L)}$) favorece el crecimiento del banano en invernadero, mejorando la LA, PST y NH. Esto sugiere que el microorganismo podría emplearse como principio activo de un inoculante en ambos cultivos, mejorando su crecimiento y desarrollo.

3.2 Introducción

Los géneros *Bacillus* y *Clostridium* son parte de la familia Bacillaceae y tienen la capacidad de formar esporas bacterianas, las cuales son resistentes a condiciones de estrés y

permiten la supervivencia del microorganismo. La diferencia entre estos dos géneros radica principalmente en sus requerimientos de oxígeno, ya que *Bacillus* está conformado por organismos anaerobios facultativos (Nakano & Zuber, 1998), mientras que *Clostridium* son anaerobios estrictos (Turnbull, 1996). *B.subtilis* es una especie del género *Bacillus*, considerada modelo para estudios de diferenciación celular, esporulación y germinación de las esporas, y se emplea como principio activo para el desarrollo de productos biotecnológicos debido a que las esporas facilitan la producción de formulados sin afectar significativamente la viabilidad celular en el tiempo; y al germinar se convierten en células vegetativas metabólicamente activas (Toyota, 2015).

Las esporas de *Bacillus* son estructuras altamente organizadas, conformadas por una serie de capas (*exosporium*, saco de la spora, membrana interna, cortex, pared celular y membrana externa) que recubren el material genético, núcleo, ribosomas, enzimas y la poca agua disponible, con el fin de protegerlos y permanecer en dormancia. Pero cuando existen los estímulos adecuados, desencadenan el proceso de germinación y se convierten en células vegetativas (Setlow, 2014). Los estímulos que activan su germinación no se han dilucidado completamente, pero se sabe que los aminoácidos L-alanina, L-valina y L-asparagina son activadores (Ghosh & Setlow, 2010). Sus células vegetativas en cambio, son metabólicamente activas y podrían llegar a esporular en caso de que existan condiciones adversas que no permitan su actividad (Branda et al., 2001). Para la producción de este tipo de estructuras se emplean medios de cultivos diferentes. Existen reportes de medios de cultivos diseñados para la producción de esporas de *Bacillus* (Chen et al., 2010; Monteiro et al., 2005; Posada-Uribe et al., 2015) en los que se emplean sales y compuestos implicados en la cadena de señalización para la producción de esporas (Errington, 2003), y posteriormente se realiza un choque térmico de los cultivos con el fin de seleccionar sólo las esporas presentes (Turnbull et al., 2007). Para la obtención de células vegetativas se emplean cultivos con alta concentración de nutrientes, los cuales mantienen metabólicamente activas las células (Sella et al., 2014).

Tanto esporas como células vegetativas de *Bacillus* han sido evaluadas en conjunto para promoción de crecimiento en diversos cultivos a nivel de invernadero y campo (Adesemoye et al., 2008; Jetiyanon & Plianbangchang, 2010; Jetiyanon et al., 2008). Sin embargo, poco se conoce de la promoción de crecimiento al aplicar estas estructuras por separado, ó en diferentes concentraciones (Hassen & Labuschagne, 2010; Kavino et al., 2010; Yuan et al.,

2013). Adicionalmente, hay mucho por indagar sobre los resultados de promoción en diferentes sustratos a nivel *in vitro*, en invernadero ó en campo. Existen algunos estudios evaluando medios como Murashige and Skoog (MS), arena, vermiculita, perlita (Huang et al., 2015; Taulé et al., 2016) ó solución de Hoagland (Chen et al., 2016; Majeed et al., 2015), pero la mayoría de trabajos emplean suelo en condiciones de invernadero. El estudio de diferentes sustratos en diferentes etapas de producción de los cultivos, las diferentes concentraciones de aplicación y el tipo de estructura bacteriana a inocular es de interés debido a que se ha encontrado una baja reproducibilidad en las evaluaciones con PGPR's (Khalid et al., 2004) y en la medida que se conozca cómo afectan estos factores el éxito de la promoción, se tendrá mayor comprensión de la interacción planta-PGPR; con miras a la estandarización de los procesos y predicción de los resultados en diferentes condiciones de aplicación.

Este capítulo presenta el potencial promotor de crecimiento de *B.subtilis* EA-CB0575 en dos cultivos de interés económico: banano y tomate. Para ello se evalúa la aplicación del microorganismo a nivel de invernadero en suelo, e *in vitro* en medio MS_(s) y MS_(L). Se emplearon las células vegetativas ó esporas del microorganismo y en algunos casos, dos concentraciones de aplicación (10^7 y 10^8 UFC/mL), con el fin de determinar el efecto de la inoculación de cada estructura y de la concentración del microorganismo en la promoción de crecimiento. Finalmente, se realizaron evaluaciones en banano inoculando el microorganismo desde medio *in vitro* MS, llevando posteriormente las plantas a etapa de enraizamiento e invernadero; para determinar el efecto de la aplicación del microorganismo en etapas tempranas de desarrollo.

3.3 Materiales y métodos

3.3.1 Microorganismo y condiciones de cultivo

Se empleó el microorganismo *B.subtilis* EA-CB0575 aislado de la rizósfera de banano variedad Valery por Ramírez, 2012. Esta bacteria se cultivó en medio SBM (1,04 g/L de C₆H₁₂O₆; 0,59 g/L de FeSO₄*7H₂O; 6 g/L de KH₂PO₄; 5 g/L de extracto de levadura LP0021T Oxoid; 3 g/L de peptona especial LP0072B Oxoid y 0,01 g/L de NaCl) (Posada-Uribe et al., 2015) para la producción de esporas, y en medio TSB (105459, Merck) para la producción de células vegetativas. La producción de biomasa se realizó transfiriendo dos colonias de

B. subtilis EA-CB0575 en medio TSA x 0,5 (105458, Merck) a un volumen de medio del 20% del volumen total del Erlenmeyer e incubando a 24 o 72 h para la producción de células vegetativas y esporas respectivamente, en ambos casos a 150 rpm y 30°C.

3.3.2 Material vegetal y condiciones de cultivo

Las evaluaciones en tomate (*Lycopersicon esculentum*) variedad Chonto-Santa Cruz se realizaron empleando semillas marca Rancho Los Molinos para los ensayos realizados en sustrato con baja cantidad de materia orgánica y semillas de la misma variedad de la marca Agrosemillas para las evaluaciones en sustrato con alta cantidad de materia orgánica. Estas se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 5% por 10 min, seguido de dos lavados con agua destilada estéril (ADE) y posteriormente etanol al 70 % por 3 min. Se aplicó vacío al sistema (-100 KPa) y se realizaron tres lavados con ADE. Una muestra de 10 semillas desinfectadas se dispuso en la superficie de una caja Petri con medio TSA x 0,5 para determinar la presencia de contaminación en el lote de semillas; la ausencia de crecimiento de microorganismos indicó una buena desinfección. Las otras semillas se estratificaron sumergiendo en ADE y llevando a 4°C por 24 h, para emplearse en las diferentes evaluaciones. Para las evaluaciones en suelo con baja materia orgánica se empleó una cámara microclimática (Convion 125 L, Mani-Toba, Canadá) a temperatura media de 30°C y una humedad relativa del 70%. Las evaluaciones en suelo rico en nutrientes se realizaron en el invernadero de la Universidad EAFIT, Medellín, Colombia con condiciones variantes de acuerdo al clima de la zona, las condiciones medias fueron: temperatura de 22-30 °C, fotoperiodo 12/12 h y humedad relativa media de 65%. Para las evaluaciones a nivel *in vitro* se empleó el cuarto de cultivo del Laboratorio de Biotecnología de la Universidad EAFIT, a 23°C para tomate, con un fotoperiodo de 12h/12h.

Para las evaluaciones en banano (*Musa AAA*) se emplearon plantas producidas desde meristemos de la variedad Williams por Meristemos de Colombia. Dependiendo del tipo de evaluación, se trabajó con estas plantas en dos etapas de desarrollo diferentes: Las evaluaciones en suelo a nivel de invernadero emplearon plantas en etapa de endurecimiento en una mezcla de turba-suelo (con aproximadamente un año de desarrollo desde meristemos) y las evaluaciones a nivel *in vitro* en medio MS (Murashige & Skoog, 1962). Se emplearon plantas provenientes de meristemos en etapa de enraizamiento y aún en medio MS (entre 9-10 meses de desarrollo). Las condiciones del invernadero donde se

dispusieron los ensayos son las mismas enunciadas para los ensayos en tomate y para las evaluaciones a nivel *in vitro* se empleó el cuarto de cultivo del Laboratorio de Biotecnología de la Universidad EAFIT, a 30°C para banano, con un fotoperiodo de 12h/12h.

3.3.3 Sustratos empleados

Para los cultivos en suelo se emplearon dos sustratos para las evaluaciones en tomate: un sustrato comercial del Vivero Tierra Negra compuesto por 76% arena, 22% limo y 2% arcilla. De estas proporciones el 17% corresponde a materia orgánica, además este sustrato contenía (cantidades en mg/Kg) 8 de P, 33 de S, 71 de Fe, 5 de Mn, 3 de Cu, 7 de Zn, 0,18 de B, 118 de Ca, 65 de Mg, 17,6 de K y 1,7 de Na y pH 6,7. Este sustrato se mezcló en una proporción 4 partes de suelo por 1 de cisco. Se empleó además un sustrato de desierto (suelo árido) compuesto por (cantidades en mg/ kg de suelo seco): 3750 de Ca, 790 de Na, 750 de Mg, 2300 de N, 1000 de P, 100 de ortofosfato, 500 de K; 0,74 de Cu; 0,77 de Zn; 3,85 de Fe; 55 de Mn, 0,4% de materia orgánica; 12000 de sólidos totales disueltos, una conductividad de 2400 MS/cm; 5,3 g de C/Kg; 18,6 de C inorgánico/Kg y pH 6,8 sin mezcla (análisis de suelos en Anexo IV). Para las evaluaciones en banano se empleó el sustrato comercial Vivero Tierra Negra enunciado y mezclado como se explicó previamente. Para los cultivos *in vitro* se empleó medio MS_(s) compuesto por 4,33 g/L de mezcla de sales para MS (M524 Phytotech Laboratories) y 5 g/L de bactoagar (064010023 BD Becton Dickinson Company, USA) a pH de 5,7 y sin adición de fuente de carbono. Para los cultivos en medio MS_(L) se empleó la mezcla de sales en la misma cantidad, sin adición de agar, al mismo pH y sin adición de agar. Para este último caso se usaron 9 g de perlita estéril por recipiente de 500 mL.

3.3.4 Evaluación de promoción de crecimiento de *B.subtilis* EA-CB0575 en tomate

Las evaluaciones en tomate incluyeron 4 tipos de experimentos: 1) en suelo con alta cantidad de materia orgánica a nivel de invernadero, 2) en suelo con baja cantidad de materia orgánica en cámara de crecimiento, 3) a nivel *in vitro* en medio MS_(s) y 4) *in vitro* en MS_(L). Las evaluaciones se realizaron en diferentes sustratos con el fin de determinar si el microorganismo promueve el crecimiento al cambiar el sustrato de trabajo. En todos los casos, los ensayos emplearon el material vegetal desde semillas estratificadas y se empleó

un diseño de experimentos completamente aleatorio (DCA) cuyo factor de estudio fue el tratamiento evaluado.

▪ **Evaluación en suelo a nivel de invernadero/ cámara microclimática.**

Las semillas se inocularon empleando los siguientes tratamientos: esporas a $1 \cdot 10^8$ UFC/mL y a $1 \cdot 10^7$ UFC/mL, células vegetativas a $1 \cdot 10^7$ UFC/mL y a $1 \cdot 10^8$ UFC/mL, y control sin inoculación, sumergiéndolas por 1 h en las suspensiones respectivas y empleando ADE para el control. Posteriormente se secaron por 20 min en la cámara de flujo y se procedió a la siembra en el sustrato. Las plantas obtenidas se fertilizaron con 15-15-15 a nivel edáfico y Wuxal tapa negra 1 cc/L cada mes. Para el ensayo con baja concentración de materia orgánica (2 meses de duración) se realizaron dos evaluaciones en tiempos independientes (julio y agosto de 2014) en cámara microclimática. Para el ensayo en suelo con alta cantidad de materia orgánica se realizaron dos evaluaciones (diciembre de 2014 y mayo de 2015) con duración de 1 mes cada uno en invernadero. Las variables de respuesta evaluadas fueron longitud de la planta (LA), diámetro de la planta (DP), peso seco aéreo (PSA), peso seco radical (PSR) y peso seco total (PST). Se emplearon 10 unidades experimentales por tratamiento en ambos casos.

▪ **Evaluación en sustrato MS(s) ó MS(L) a nivel *in vitro***

Se determinó el porcentaje de germinación y vigor de semillas con y sin aplicación del microorganismo. Las semillas se inocularon con los tratamientos enunciados previamente para los ensayos en suelo y se sembraron en cajas de Petri de 100*15 mm, se dispusieron alineadas en el centro de la caja de Petri con medio MS_(s) y se incubaron en oscuridad con 45° de inclinación. Transcurridos 7 d se determinó el porcentaje de germinación, el índice de vigor (VI) y el índice de germinación (GI) de las semillas, de acuerdo a las ecuaciones 3-1 y 3-2. Cada tratamiento se realizó con 8 unidades experimentales y cada unidad experimental con 10 semillas.

$$VI = (L * GI) \quad \text{Ecuación 3-1.} \quad GI = \left(\frac{G}{t}\right) \quad \text{Ecuación 3-2.}$$

Donde VI es el índice de vigor, L es la Longitud de la plántula, GI es el índice de germinación, G es el número de semillas germinadas, y t es el tiempo de evaluación de la germinación.

Para evaluar el efecto de *B.subtilis* EA-CB0575 sobre el crecimiento de las plantas, se inocularon las semillas con esporas ó células vegetativas del microorganismo a $1 \cdot 10^8$

UFC/mL y se sembraron en frascos de 500 mL con 100 mL de medio MS_(s) o con 100 mL de medio MS_(L) más 9 g de perlita estéril y se sellaron con papel parafilm. Se emplearon 6 semillas por frasco y 8 frascos por tratamiento. Las plántulas se evaluaron luego de un mes de crecimiento a nivel *in vitro*. Se realizaron 3 evaluaciones en tomate en medio MS_(s) y 3 evaluaciones en medio MS_(L). Se evaluaron las variables de respuesta LA, Dp y el PST.

3.3.5 Evaluación de promoción de crecimiento de *B.subtilis* EA-CB0575 en banano.

Las evaluaciones en banano comprendieron 5 tipos de experimentos diferentes: 1) en suelo a nivel de invernadero, 2) a nivel *in vitro* en medio MS_(s), 3) a nivel *in vitro* en MS_(L), 4) una evaluación inoculando desde etapa *in vitro* en medio MS_(s), posterior paso a etapa de enraizamiento y luego paso a invernadero; 5) una evaluación como la previamente enunciada pero empleando medio MS_(L) a nivel *in vitro*. El diseño estadístico evaluado fue un DCA (Diseño completamente aleatorio) con el tratamiento evaluado como factor de estudio.

▪ Evaluaciones en suelo a nivel de invernadero

Las plantas provenientes de cultivo de meristemas se inocularon sumergiendo sus raíces por una hora en los tratamientos: esporas a $1 \cdot 10^8$ UFC/mL, esporas a $1 \cdot 10^7$ UFC/mL, células vegetativas a $1 \cdot 10^8$ UFC/mL, células vegetativas a $1 \cdot 10^7$ UFC/mL y control sin inoculación (ADE estéril); se llevaron a una agitación de 100 rpm en un shaker y se sembraron en el sustrato tierra negra. Las plantas obtenidas se fertilizaron con 15-15-15 a nivel edáfico 1 g/planta y Wuxal tapa negra 1 cc/L cada mes. El ensayo tuvo una duración de 4 meses, y se realizaron tres evaluaciones en tiempos independientes (Mayo de 2014, Enero de 2015 y Enero de 2016). Las variables de respuesta evaluadas fueron LA, perímetro de la planta (Ppl), número de hojas (NH), PSA, PSR y PST. Se usaron 15 unidades experimentales por tratamiento.

▪ Evaluaciones a nivel *in vitro* en sustrato MS_(s) ó MS_(L)

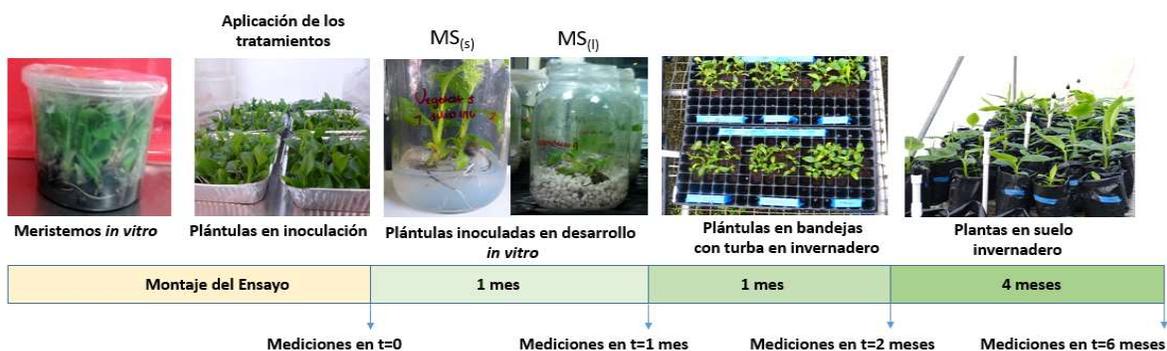
Las plantas se inocularon con el microorganismo sumergiendo las raíces en la suspensión bacteriana por 1 h, las plantas control se sumergieron en ADE, se secaron y sembraron en medio MS_(s) o MS_(L) y se sellaron con papel parafilm. 30 DDI se evaluaron las variables de respuesta LA, Ppl, PFA, PFR, PFT, PSA, PSR, PST y NH. Se usaron 8 unidades

experimentales por tratamiento y cada unidad con 2 plántulas. Los ensayos se repitieron 3 veces en tiempos independientes tanto en MS_(s) como en MS_(L).

▪ **Evaluación con inoculación en etapas tempranas y seguimiento hasta crecimiento a nivel de invernadero**

Con el fin de determinar el efecto de la inoculación de *B. subtilis* EA-CB0575 desde etapas tempranas del desarrollo de plantas de banano sobre el crecimiento vegetal a nivel de invernadero, se aplicó la cepa EA-CB0575 en plantas provenientes de meristemas, las cuales se sembraron a nivel *in vitro* en medio MS_(s) y MS_(L). Para ello, las plántulas se sumergieron en las suspensiones bacterianas correspondientes a los tratamientos esporas y células vegetativas a 1×10^8 UFC/mL por 1 h, se secaron y sembraron en medio MS_(s) o MS_(L) según el caso. Treinta DDI se trasplantaron a bandejas de enraizamiento con una mezcla de turba: suelo (1:1) por 30 días. Posteriormente, se trasplantaron a bolsas con 3 kg de sustrato comercial y permanecieron en evaluación por 4 meses, bajo las condiciones ambientales del invernadero, previamente mencionadas (Figura 3-1). En todos los casos, las plántulas se dispusieron aleatoriamente en la zona de crecimiento y en el invernadero.

Figura 3-1. Proceso de evaluación de plantas de banano desde nivel *in vitro* hasta final de la etapa de invernadero



Las plantas se evaluaron en cuatro tiempos: primero en el momento de la siembra *in vitro*, cuando se pasaron de medio MS *in vitro* a bandejas de enraizamiento (30 DDI), a los 30 d en bandejas (60 DDI), y finalmente luego de 4 meses de crecimiento de las plantas en invernadero (180 DDI). Estas evaluaciones se repitieron dos veces en tiempos independientes, tanto para MS_(s) como para MS_(L) (Marzo y Mayo de 2016). Las variables de respuesta fueron las previamente enunciadas para las evaluaciones en invernadero en banano. Se emplearon 24 unidades experimentales por tratamiento.

3.3.6 Análisis estadístico

Los datos obtenidos en los diferentes ensayos fueron analizados estadísticamente por medio de un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 90% para las evaluaciones en suelo y del 95% para las evaluaciones a nivel *in vitro*. Se verificaron los supuestos del ANOVA por medio del test de Shapiro Wilks y Kolmogorov para el supuesto de Normalidad, el test de Bartlett's y Cochran para homocedasticidad y la gráfica de residuos vs. orden de corrida para el supuesto de independencia. La diferencia entre las medias de los tratamientos fue evaluada con un análisis de rangos múltiples por medio de la prueba LSD y se realizó un análisis de diferencias de medias entre el control y los diferentes tratamientos empleando la prueba de Dunnet en el software R.

3.4 Resultados

3.4.1 *B. subtilis* EA-CB0575 promueve el crecimiento de plantas de tomate a nivel de invernadero e *in vitro*

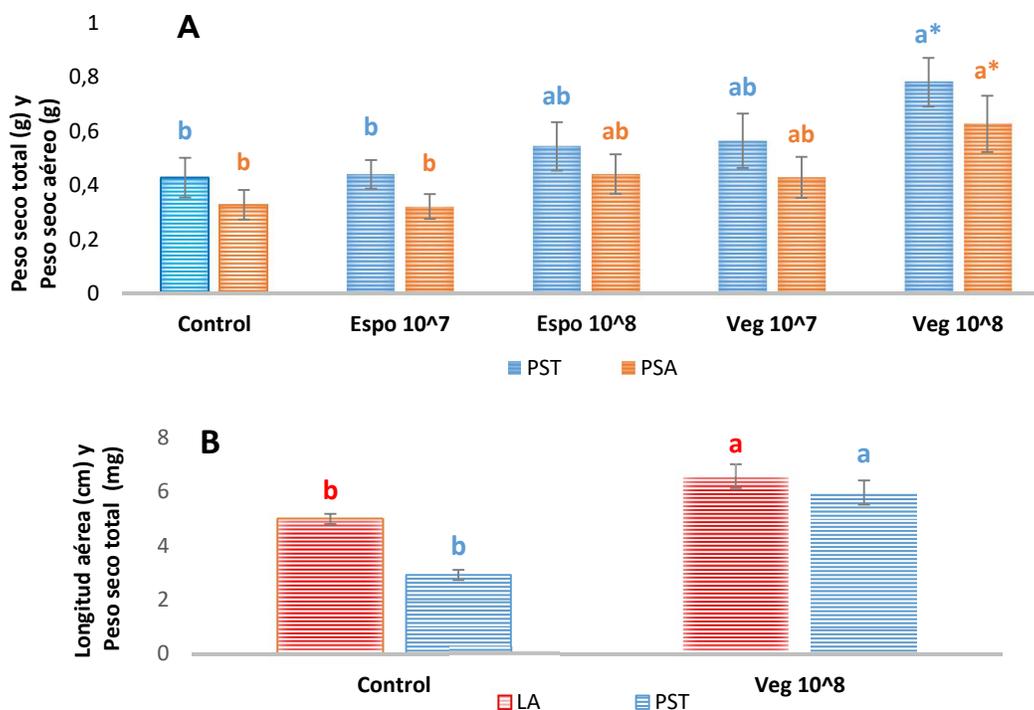
Con el fin de evaluar el efecto de *B. subtilis* EA-CB0575 en la promoción de crecimiento de tomate, se realizaron evaluaciones aplicando la rizobacteria en forma de células vegetativas o esporas, a diferentes concentraciones y en sustratos diferentes (sustrato con alta cantidad de materia orgánica, con baja cantidad de materia orgánica, medio MS_(s), medio MS_(L)).

▪ Evaluación de la promoción de crecimiento en suelo con alto/bajo contenido de materia orgánica.

Cuando se evaluó la aplicación de *B. subtilis* EA-CB0575 en suelo con alto contenido de materia orgánica, se encontró que *Bacillus* en forma de células vegetativas promovió significativamente el PST y PSA de las plantas de tomate 60 DDI cuando se aplicó en las semillas de tomate a 1×10^8 UFC/mL (Figura 3-2A). Se alcanzaron aumentos de 82,5% y 90,9% respectivamente, con relación al control no inoculado. Las variables PSR, LA y NH no fueron afectadas significativamente por la aplicación de *B. subtilis* EA-CB0575. Por otro lado, en el suelo árido con baja cantidad de materia orgánica, se determinó que LA y PST de las plantas inoculadas con el microorganismo en forma de células vegetativas a una concentración de 1×10^8 UFC/mL aumentaron significativamente a los 30 DDI; con

porcentajes de aumento de 104,6 y 31,8% respectivamente, con relación el control (Figura 3-2B).

Figura 3-2. Efecto de diferentes concentraciones de esporas y células vegetativas de *B. subtilis* EA-CB0575 en el crecimiento de plantas de tomate en sustratos con A) alto contenido de materia orgánica después de 60 DDI y B) bajo contenido de materia orgánica después de 30 DDI.

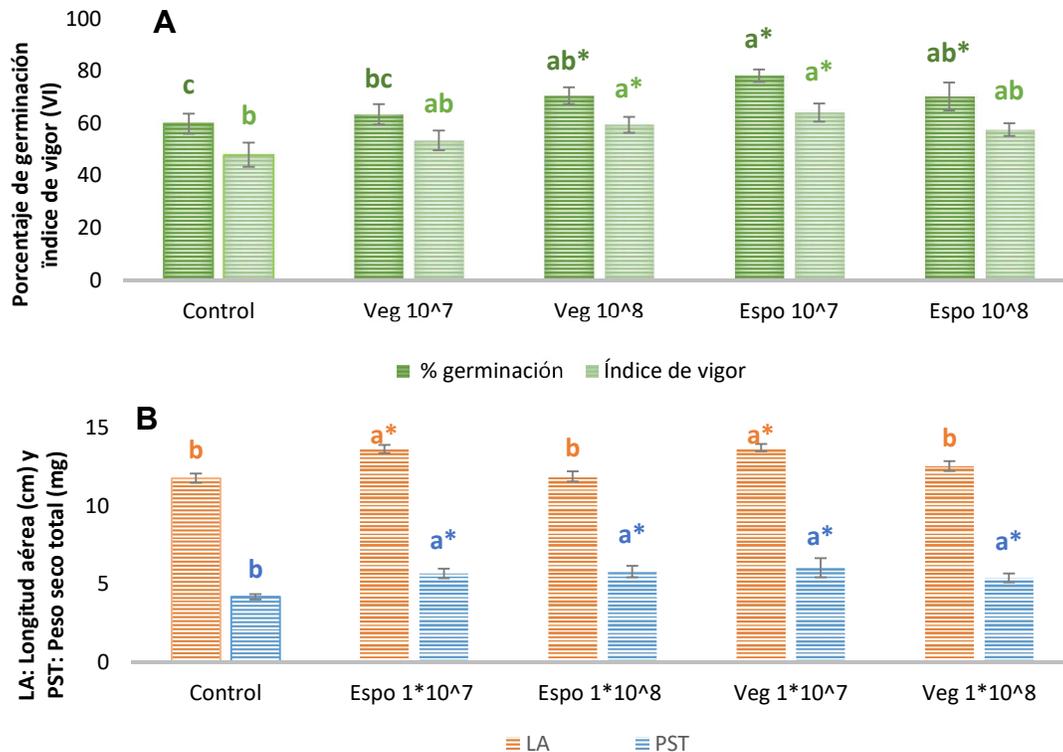


Los datos son los promedios de 2 evaluaciones en tiempos diferentes (cada uno con n = 10). Letras diferentes corresponden a tratamientos con diferencias significativas de acuerdo al test LSD (A. PSA valor-P=0,0627; PST valor-P= 0,0524; B. LA valor-P=0,002, PST valor-P=0,0227). Los asteriscos corresponden a los tratamientos con diferencias significativas con el control agua por el test de Dunnett, con 90% de confianza.

▪ Evaluación a nivel *in vitro* en medio MS_(S)

Se determinó que la aplicación de la cepa *B. subtilis* EA-CB0575 aumenta significativamente el porcentaje de germinación y vigor de las semillas de tomate y el crecimiento de la planta en PST y LA en medio MS_(S) (Figura 3-3B). El porcentaje de germinación de las semillas aumentó al aplicar esporas a una concentración de 1*10⁷ y 1*10⁸ UFC/mL, y con células vegetativas a 1*10⁸ UFC/mL, con un porcentaje de aumento entre 17,4 y 30,6%, con relación al control sin inoculación.

Figura 3-3. Efecto de diferentes concentraciones de esporas y células vegetativas de *B.subtilis* EA-CB0575 en A) la germinación e índice de vigor de las semillas de tomate y B) en la promoción de crecimiento de tomate a nivel *in vitro* en medio MS_(s) 30 DDI.



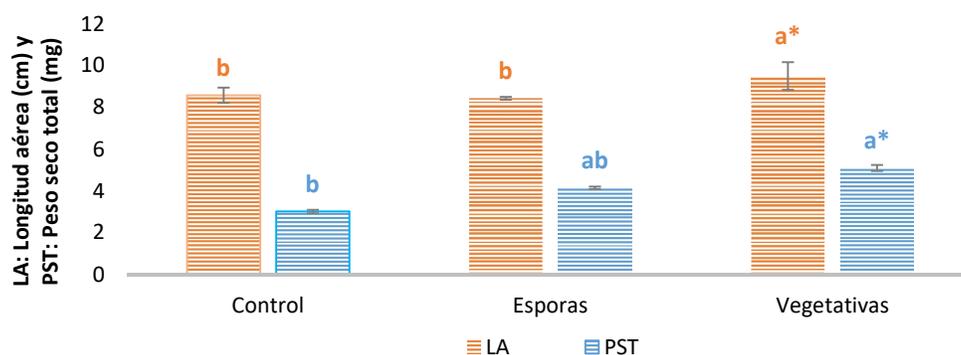
Los datos son los promedios de 3 evaluaciones en tiempos diferentes (cada uno con n = 8). Se emplearon 10 semillas por unidad experimental. Letras diferentes corresponden a tratamientos con diferencias significativas de acuerdo al test LSD (**A.** Porcentaje de germinación valor-P=0,0301, índice de vigor valor-P=0,035 **B.** LA: valor-P=0,0245; PST: Valor-P=0,004). Los asteriscos corresponden a los tratamientos con diferencias significativas con el control agua por el test de Dunnett. Se empleó un 95% de confianza. Los resultados corresponden a datos obtenidos a los 15 DDI para las evaluaciones de germinación y a los 30 DDI para promoción de crecimiento.

Al evaluar el índice de vigor de las semillas inoculadas frente a las no inoculadas se encontraron aumentos significativos al aplicar células vegetativas a 1*10⁸ UFC/mL y esporas a la menor concentración. La cepa EA-CB0575 en forma de células vegetativas y esporas a 1*10⁷ UFC/mL incrementó significativamente LA con aumentos medios del 15,1%, mientras que el PST presentó aumentos promedio de 36,7%% con diferencias significativas con el control. Se determinaron además diferencias significativas en LR de las plantas inoculadas con dos tratamientos: Esporas 1*10⁷ UFC/mL y vegetativas 1*10⁸ UFC/mL (Anexo V), sin embargo, PSR no presentó diferencias entre los tratamientos.

▪ **Evaluación a nivel *in vitro* en Medio MS_(L) empleando soportes inertes.**

Al evaluar el efecto de la inoculación de la bacteria en semillas de tomate en un sistema hidropónico con medio MS_(L) se determinó que existen diferencias significativas entre los tratamientos respecto al control en las variables LA, PSA, PSR y PST (Figura 3-4, Anexo V). Los porcentajes de aumento globales de las diferentes variables evaluadas estuvieron entre 10,7 y 69,3%.

Figura 3-4. Efecto de diferentes concentraciones de esporas y células vegetativas de *B.subtilis* EA-CB0575 en el crecimiento de plantas de tomate en medio MS_(L).



Los datos son los promedios de 2 evaluaciones en tiempos diferentes (cada uno con n=5). Letras diferentes corresponden a tratamientos con diferencias significativas de acuerdo al test LSD (LA valor-P=0,0001, PST valor-P=0,0257). Los asteriscos corresponden a los tratamientos con diferencias significativas con el control agua por el test de Dunnett, ambos con 95% de confianza. Los resultados corresponden a datos obtenidos 30 DDI.

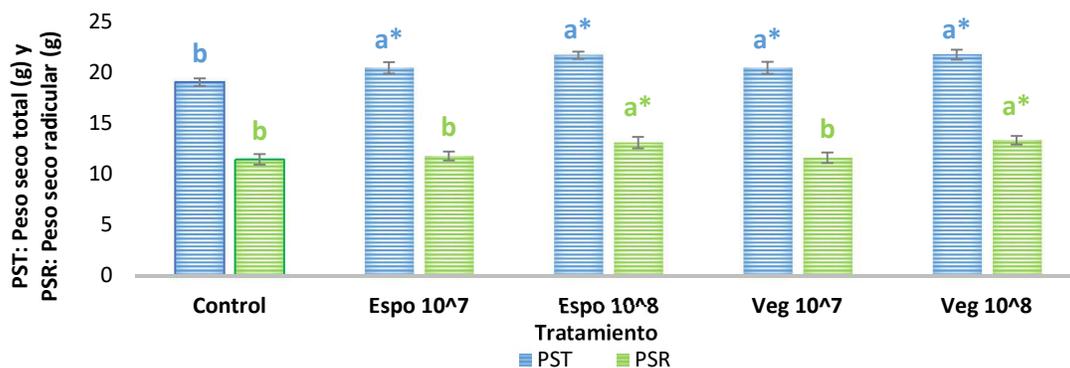
3.4.2 *B.subtilis* EA-CB0575 promueve el crecimiento de banano y puede emplearse desde etapa *in vitro* para mejorar el crecimiento en invernadero

Con el fin de evaluar el efecto de *B.subtilis* EA-CB0575 en la promoción de crecimiento de banano, se realizaron evaluaciones aplicando la rizobacteria en forma de células vegetativas o esporas a diferentes concentraciones y en diferentes etapas de crecimiento de la planta (invernadero e *in vitro*) y se realizó una evaluación completa donde se inocularon las plantas desde etapas tempranas de desarrollo a nivel *in vitro*, posteriormente se realizó el paso a bandejas de enraizamiento y luego a bolsas en invernadero.

▪ **Evaluación de la promoción de crecimiento de banano en suelo a nivel de invernadero.**

Al aplicar *B.subtilis* EA-CB0575 a las raíces de plantas de banano a nivel de invernadero, se encontró un incremento significativo del PSR y PST después de 4 meses de aplicación (Figura 3-5). El PST se incrementó en promedio un 10,6 % al inocular la cepa en forma de células vegetativas o esporas en ambas concentraciones, respecto al control. Por otro lado, el PSR se incrementó en promedio un 15,5 % al inocular células vegetativas o esporas a una concentración de 10^8 UFC/mL.

Figura 3-5. Efecto de diferentes concentraciones de esporas y células vegetativas de *B.subtilis* EA-CB0575 en el crecimiento de plantas de banano en sustrato comercial a nivel de invernadero a los 120 DDI.



Los datos son los promedios de 3 evaluaciones en tiempos diferentes (cada uno con $n = 15$). Letras diferentes corresponden a tratamientos con diferencias significativas de acuerdo al test LSD (PST valor- $P=0,0052$; PSR valor- $P= 0,0224$). Los asteriscos corresponden a los tratamientos con diferencias significativas con el control agua por el test de Dunnett, ambos con 90% de confianza.

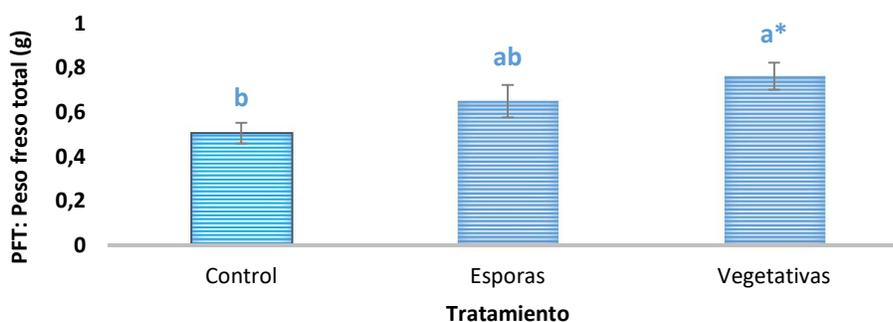
▪ **Evaluación a nivel *in vitro* en medio MS_(s)**

Para evaluar la promoción de crecimiento de meristemas de banano en etapa *in vitro* se procedió a la aplicación del microorganismo a nivel de raíz empleando esporas o células vegetativas de *B.subtilis* EA-CB0575 a $1 \cdot 10^8$ UFC/mL en medio MS_(s). Se determinó que hasta el momento de paso a bandejas con mezcla turba-suelo (30 DDI), no se presentaron diferencias significativas en ninguna de las variables evaluadas, aunque si se observaron medias superiores, específicamente en LA, para los tratamientos con la aplicación del microorganismo (Anexo V).

▪ Evaluación de nivel *in vitro* en medio MS_(L)

Con el fin de evaluar la promoción de crecimiento *in vitro* en el sustrato MS_(L), se realizó la aplicación del microorganismo en las raíces de banano y se procedió como se describió en el numeral anterior, con la diferencia que las plantas se sembraron en frascos con perlita y medio MS_(L). Se determinó que la aplicación del microorganismo favoreció el PFT de las plantas con aplicación de las células vegetativas con un aumento de 50,6% respecto al control. Adicionalmente, en una de las evaluaciones realizadas se determinó la existencia de diferencias significativas en LA de plantas inoculadas respecto al control (Anexo V).

Figura 3-6. Efecto de la aplicación de *B. subtilis* EA-CB0575 en forma de esporas o células vegetativas a 1×10^8 UFC/mL en el crecimiento de las plantas de banano en medio MS_(L).

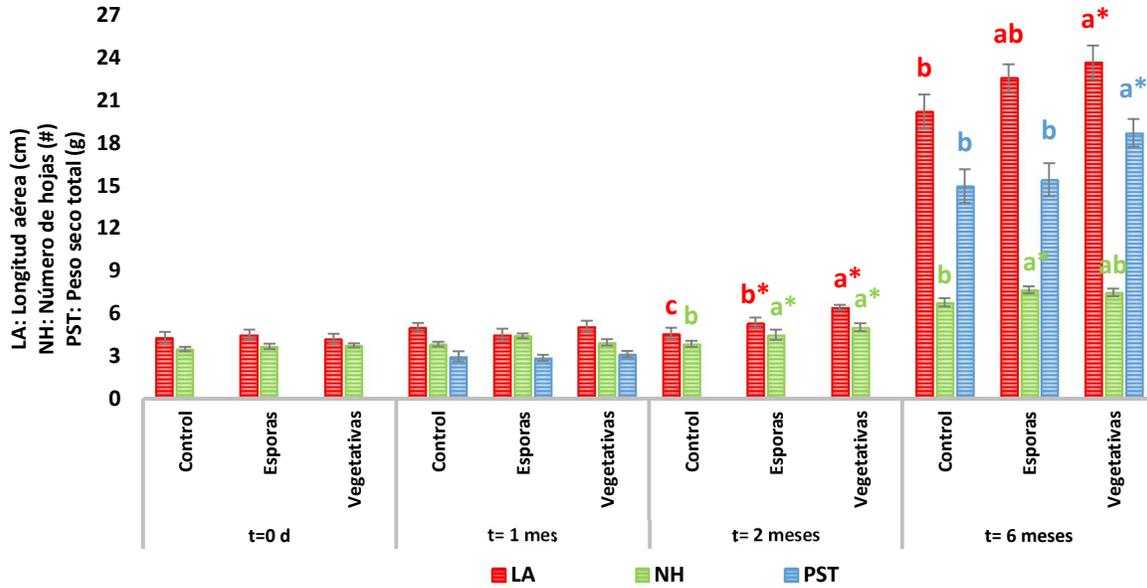


Los datos son los promedios de 3 evaluaciones en tiempos diferentes (n= 8). Letras diferentes corresponden a tratamientos con diferencias significativas de acuerdo al test LSD (valor-P=0,0243). Los asteriscos corresponden a los tratamientos con diferencias significativas con el control agua por el test de Dunnett, ambos con 95% de confianza.

▪ Evaluación con inoculación en etapas tempranas y seguimiento hasta crecimiento a nivel de invernadero

Con la finalidad de determinar el efecto a largo plazo de la inoculación del microorganismo desde etapas tempranas de crecimiento de plantas de banano en medio MS_(s), se realizaron mediciones de LA, NH y PST en diferentes tiempos (Figura 3-7). Se observó que las plantas inoculadas con *B. subtilis* EA-CB0575 no presentan diferencias significativas con el control entre el momento de inicio del ensayo y el primer mes de desarrollo, pero para los dos meses (primer mes en bandejas de enraizamiento), se determinaron diferencias en LA y NH en los tratamientos con el *Bacillus*, con aumentos entre 16,7 y 40,4% para LA y entre 16,7 y 30,1% para NH.

Figura 3-7. Efecto de la aplicación de esporas o células vegetativas de *B. subtilis* EA-CB0575 en la promoción de crecimiento de plantas de banano inoculadas desde etapa *in vitro* en MS_(s) hasta etapa de invernadero.

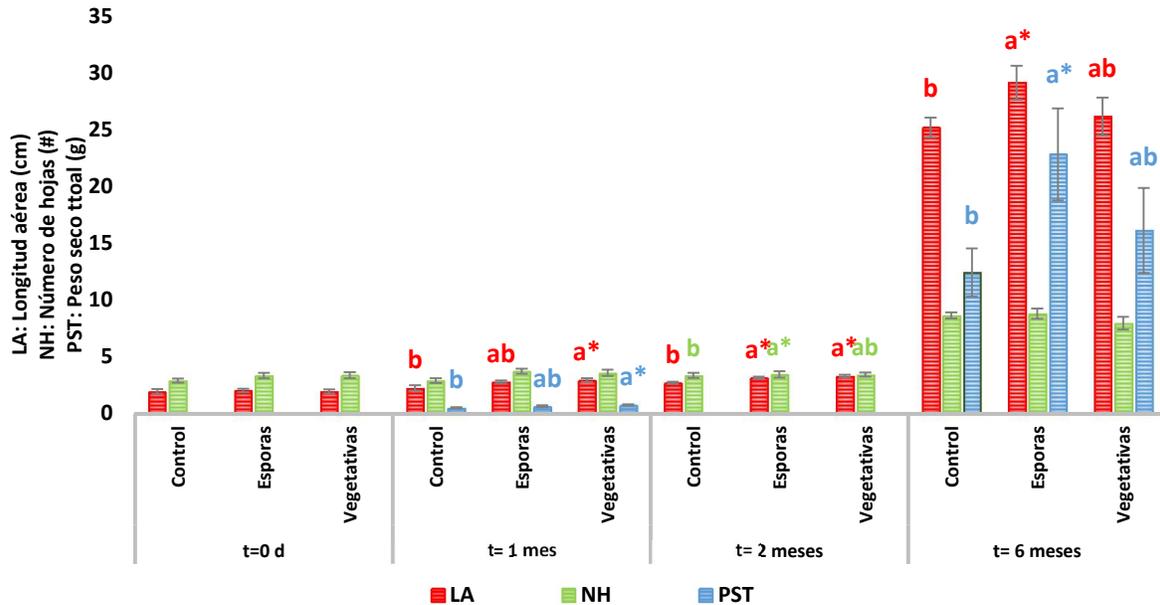


Los datos son los promedios de 2 evaluaciones en tiempos diferentes (n = 24). Letras diferentes corresponden a tratamientos con diferencias significativas de acuerdo al test LSD (Tiempo 2 meses: LA. Valor-P=0,000; NH. Valor-P=0,0007. Tiempo 6 meses: LA. Valor-P=0,096. NH. Valor-P=0,0797. PST. Valor-P= 0,026). Los asteriscos corresponden a los tratamientos con diferencias significativas con el control agua por el test de Dunnett con 90% de confianza.

Cuando las plantas alcanzaron 4 meses de desarrollo a nivel de invernadero se realizaron las mediciones finales (6 MDI), observando que las plantas donde se habían aplicado la rizobacteria en forma vegetativa presentaron una mayor LA y PST que el control sin aplicación del microorganismo, con aumentos de 17,1% y 25,1% respectivamente; además en este mismo tiempo el NH de las plantas con aplicación de esporas del microorganismo presentaron un aumento significativo del 12,9% con el control. Se realizó una evaluación con las mismas especificaciones que el ensayo anterior, pero se cambió el medio a MS_(L) y se realizaron evaluaciones en los mismos tiempos y para las mismas variables de respuesta (Figura 3-8). Se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos a partir de 1 MDI siendo el tratamiento con aplicación de células vegetativas el que presentó diferencias significativas respecto al control con aumentos de 30,9% para LA y 48,9% para el PST. En el 2 MDI se determinaron diferencias tanto de las esporas como de las células vegetativas en LA, respecto al tratamiento sin aplicación de células, con un aumento promedio de 19,4% y de 2,6% en NH cuando se aplicaron las esporas del *Bacillus*. En la medición final (6 MDI)

se determinaron diferencias significativas en los tratamientos con aplicación de esporas en las variables LA y PST con aumentos de 15,7% y de 83,6% respectivamente.

Figura 3-8. Efecto de la aplicación de esporas o células vegetativas de *B. subtilis* EA-CB0575 en la promoción de crecimiento de plantas de banano inoculadas desde etapa *in vitro* en MS_(L) hasta etapa de invernadero.



Los datos son los promedios de 2 evaluaciones en tiempos diferentes (n=24). Letras diferentes corresponden a tratamientos con diferencias significativas de acuerdo al test LSD (Tiempo 1 mes: LA. Valor-P=0,097; NH. Valor-P=0,0243. Tiempo 2 meses: LA. Valor-P=0,0011. NH. Valor-P=0,0955. Tiempo 6 meses= LA. Valor-P=0,0906 PST. Valor-P=0,085). Los asteriscos corresponden a los tratamientos con diferencias significativas con el control agua por el test de Dunnett, ambos con 90% de confianza.

3.5 Discusión

Esta investigación presenta la evaluación de una alternativa biológica para el desarrollo de cultivos agrícolas, la cepa evaluada es *B.subtilis* EA-CB0575, perteneciente a una especie bacteriana catalogada como segura y no riesgosa para la salud humana (VKM, 2013). El presente trabajo brinda conocimiento sobre el uso de PGPR's en cultivos perennes como banano, y hortalizas como tomate. Se evaluó el cultivo de tomate debido a su importancia económica y a que se considera una especie modelo por su simplicidad estructural y el corto tiempo requerido para llegar a la madurez (Kimura & Sinha, 2008). Se evaluó también el cultivo de banano debido a su impacto en la economía colombiana y a que es uno de los sectores de la agricultura que requieren de manera urgente alternativas al consumo de

fertilizantes, con el fin de reducir el impacto ambiental del cultivo, económico y social (FAO, 2011).

Este trabajo expone los resultados de la evaluación de factores como la estructura bacteriana empleada (esporas o células vegetativas), concentración del microorganismo (en este caso $1 \cdot 10^7$ y $1 \cdot 10^8$ UFC/mL) y el sustrato empleado en el crecimiento de las plantas. Se ha reportado que el uso de las PGPR aunque promisorio, también presenta falta de reproducibilidad entre evaluaciones; por lo que investigaciones de los factores que afecten los resultados obtenidos son de importancia para comprender la relación planta-PGPR y aportar a la reproducibilidad en los resultados. Son pocas las investigaciones reportadas sobre el efecto de diferentes factores sobre las respuestas al usar PGPR en diferentes cultivos (Bai et al., 2002; Jetiyanon & Plianbangchang, 2010; Jetiyanon et al., 2008; Ramirez & Kloepper, 2010) por lo que los resultados aquí determinados se convierten en una herramienta en el desarrollo de inoculantes biológicos con la cepa empleada.

Se determinó que las dos estructuras evaluadas pueden promover el crecimiento en los cultivos. Esto sugiere que las esporas germinan para estar metabólicamente activas y accionar los mecanismos de promoción de crecimiento vegetal mientras que las células vegetativas permanecen metabólicamente activas, por lo que tienen una ventaja en la generación de mecanismos de promoción de crecimiento. Adicionalmente, las bacterias en su forma vegetativa podrían activar sus mecanismos de movilidad para colonizar los tejidos (Dietel et al., 2013a). Se determinó que al aplicar $1 \cdot 10^7$ ó $1 \cdot 10^8$ UFC/mL hubo diferencias con el control en los ensayos realizados. Sin embargo, $1 \cdot 10^8$ UFC/mL parece ser la concentración del microorganismo más apropiada para aplicar a los cultivos, debido a que se evidenciaron resultados exitosos a esa concentración en casi todos los ensayos; además que ha presentado resultados exitosos en evaluaciones previas y en otros cultivos (Bai et al., 2002; Posada et al., 2016b; Ramirez & Kloepper, 2010). Probablemente se requiera una concentración mínima de microorganismos para que se observen diferencias respecto al control, lo cual podría deberse a la existencia de un umbral para superar los efectos de los microorganismos nativos en la rizósfera y el suelo, y poder competir y expresar sus mecanismos de acción.

En este trabajo se obtuvieron resultados de promoción de la germinación y aumento en el vigor de las semillas de tomate. Esto podría aprovecharse como valor agregado en la

comercialización de semillas inoculadas, las cuales podrían presentar mayor potencial de producción, resistencia a condiciones de estrés e incremento en el rendimiento del cultivo (Cao et al., 2008). A su vez, realizar inoculaciones tempranas de los cultivos *in vitro* para mejorar su desarrollo en etapas de enraizamiento e invernadero podría mejorar el desarrollo de banano y podría mejorar no sólo el crecimiento sino también la salud de la planta. Se determinó promoción de crecimiento del microorganismo en diferentes sustratos evaluados, sin embargo no es fácil predecir qué variables serán promovidas o qué porcentajes de aumento se obtendrán, esto debido a diferentes interacciones entre los medios, la planta y el microorganismo, a la presencia de microbiota nativa y gradientes de nutrientes en el sistema. Aunque se han reportado evaluaciones en diferentes medios *in vitro* como MS, Hoagland y Yamazaki (Krimi et al., 2016; Porcel et al., 2014; Vaikuntapu et al., 2014), no se han realizado comparaciones del potencial promotor entre medios y en diferentes etapas fenológicas de la planta. Se considera que el estado del medio (líquido o sólido) es uno de los factores que podrían representar mayor efecto en los resultados cuando las plantas se encuentra en etapa *in vitro* (Del Avila et al., 1996; Hussien et al., 2014), produciendo cambios en los mecanismos de movilidad del microorganismo, en su velocidad en la raíz y hacia sumideros de nutrientes, afectando su colonización y efectividad de los mecanismos de promoción de crecimiento (Gao et al., 2016; Kearns, 2010).

El cultivo de banano presentó resultados exitosos de promoción con la aplicación del microorganismo. Sin embargo, la promoción se observa en tiempos superiores a los que se requieren para plantas de ciclo corto como tomate, lo cual se ha encontrado también en otros trabajos con evaluaciones en tiempos superiores a 90 DDI (Jaizme Vega et al., 2004; Kavino et al., 2010; Mia et al., 2010; Mwangi et al., 2013). Los resultados de las evaluaciones al aplicar los microorganismos desde etapas tempranas a nivel *in vitro* indican que la presencia de *Bacillus* genera diferencias en el crecimiento de las plantas en estadíos mas avanzados. Esto se ha observado cuando se trabaja con semillas inoculadas (Baris et al., 2014; Kuan et al., 2016) o con plántulas inoculadas con las PGPR (Bergottini et al., 2015; Grobelak et al., 2015) pero no se han encontrado reportes de la aplicación de PGPR desde etapas *in vitro* en meristemos de plantas producidas por cultivo de tejidos, generando una propuesta de trabajo que permite mejorar el crecimiento de las plántulas, no sólo a nivel *in vitro* sino también cuando estas se encuentren en condiciones de invernadero.

3.6 Conclusión

En conclusión, *B.subtilis* EA-CB0575 promueve el crecimiento de las plantas de tomate Chonto y banano variedad Williams al emplear las esporas o células vegetativas del microorganismo. Se encontraron resultados promisorios a las dos concentraciones evaluadas, pero hubo mejores resultados a la máxima concentración ($1 \cdot 10^8$ UFC/mL). La promoción de crecimiento vegetal se presentó en los diferentes sustratos evaluados y con un comportamiento diferencial al evaluar los factores de estudio en los diferentes cultivos. El microorganismo se considera un potencial principio activo para inoculantes biológicos que mejoren el crecimiento y desarrollo vegetal.

4. *Bacillus subtilis* EA-CB0575: capacidad de colonización en la rizósfera de cultivos de interés agrícola.

4.1 Resumen

Diferentes cepas de *Bacillus subtilis* son PGPR's y se emplean como inoculantes biológicos en diversos cultivos. La colonización de estos microorganismos en la rizósfera es una de las características más importantes para el éxito de las inoculaciones. En este estudio se diseñó una sonda dirigida al 16S rRNA de la especie *B. subtilis* con el fin de detectar a *B. subtilis* EA-CB0575 en muestras de cultivos puros y de raíces de tomate y banano. Con el uso de esta sonda por el método de hibridación fluorescente *in situ* (FISH) fue posible diferenciar entre *B. subtilis* y otras especies del género *Bacillus* como *B. amyloliquefaciens*, *B. cereus*, *B. gibsonii*, *B. megaterium*, *B. pumilus*, entre otras, y se podría emplear para la detección de microorganismos de esa especie en diversos ambientes. En esta evaluación se determinó que *B. subtilis* EA-CB0575 coloniza las raíces de tomate y de banano cuando se inocula como esporas ó como células vegetativas. Se encontró que las esporas germinan en la medida que la planta crece debido a que se detectan células vegetativas en diferentes momentos de la evaluación y hasta los 30 DDI. En ambos cultivos se evidenció la formación de colonias en diferentes regiones de la raíz, además de la presencia de estructuras similares a biopelículas, presentándose células embebidas en una matriz extracelular. Se observó un aumento en las poblaciones de microorganismos que hibridaron en el tiempo, indicando la posible colonización de los tejidos. Se determinó que el método CARD-FISH permite mayor detección que FISH, debido a un aumento significativo en la fluorescencia de las células en las muestras y por medio de microscopía electrónica de barrido (Scanning Electron Microscopy, SEM) se corroboró la presencia de los microorganismos a los 30 DDI para ambos cultivos, y la presencia de estructuras similares a biopelículas en las raíces.

4.2 Introducción

El éxito de la introducción eficiente de inoculantes biológicos en los cultivos agrícolas requiere de su establecimiento, proliferación y actividad en condiciones *in situ* (Fan et al.,

2012b; Sørensen et al., 2001). El estudio de la colonización de los microorganismos principio activo de inoculantes, genera información sobre los patrones espacio-temporales, la formación de biopelículas, presencia de estructuras vegetativas o esporas, la interacción del microorganismo aplicado con la microbiota nativa, entre otros; para mejorar el desempeño de los microorganismos y mantener su actividad en la planta (Dazzo et al., 2015). Sin embargo, los estudios sobre colonización de las raíces con aplicación de las PGPR's se han enfocado en microorganismos Gram negativos como *Pseudomonas* sp. y *Azospirillum* sp., ampliamente empleados para promoción de crecimiento (Guerrero-Molina et al.; 2011; Buddrus-Schiemann et al., 2010), existiendo menos información disponible para el género *Bacillus* (Dietel et al., 2013).

La habilidad de una PGPR para colonizar la rizósfera es un proceso multifactorial que requiere de su habilidad para iniciar crecimiento en la superficie, invadir tejidos y desarrollarse. Este es un proceso simbiótico donde la planta brinda al microorganismo un ambiente rico en nutrientes, mientras que la bacteria brinda a la planta protección a fitopatógenos, producción de antibióticos, de enzimas y promoción de crecimiento vegetal por la producción de hormonas y solubilización de minerales (Reva et al., 2004). Dentro de los factores que afectan la colonización de las PGPR se destacan la bioquímica de la raíz y de los exudados de la planta, los cuales son quimioatrayentes para los microorganismos en la rizósfera (Bais et al., 2006); su capacidad de formación de biopelícula, lo que permite su adherencia, supervivencia y almacenamiento de nutrientes en los rizodepositos (Beauregard, 2015); y la presencia de flagelos, la cual brinda una ventaja en el momento de la quimióstasis, debido a que favorece movimientos como "swarming" y "swimming", importantes para su reclutamiento (Compant et al., 2010; Gao et al., 2016).

El proceso de colonización se compone de diferentes etapas, siendo la atracción de los microorganismos hacia la raíz la primera y más determinante de ellas (Bais et al., 2006). Esta atracción se genera por medio de la quimiotaxis a compuestos como ácidos orgánicos, polisacáridos, aminoácidos, entre otros, presentes en las raíces y exudados (Beauregard, 2015; Zhang et al., 2014). Se ha encontrado que la especie vegetal, la variedad, y la edad de la planta son factores que influyen en esta etapa, debido a que los quimioatrayentes que la planta produce varían en estas diferentes condiciones (Yuan et al., 2015). Una segunda etapa es la nutrición de los microorganismos empleando los compuestos secretados por las raíces (Haichar et al., 2008), posteriormente se presenta la formación de biopelículas, las

cuales permiten la adherencia de las células a la superficie de la raíz; proceso regulado por medio de “*Quorum Sensing*” (Vlamakis et al., 2013). En el caso de *Bacillus*, moléculas como los polisacáridos, las surfactinas, los péptidos ComX, ComP/ComA y proteínas Rap, son inductoras de estas organizaciones celulares (Dogsa et al., 2014). La etapa siguiente consiste en la generación de cambios transcripcionales y translacionales sobre diferentes microorganismos de la rizófera, debido a diferentes efectores de la planta (Fan et al., 2012a); y posteriormente se encuentra la estimulación de mecanismos de promoción de crecimiento en las bacterias benéficas, debido a las señales que reciben del entorno. Este último paso hace referencia a que la presencia de estímulos provenientes de la planta o del entorno, inducen en la bacteria la ejecución de los rasgos PGPR, aprovechados por la misma planta.

En estudios realizados para el género *Bacillus*, se ha determinado que mutaciones en genes implicados en la producción de surfactinas, formación de biopelículas, generación de movimiento por swarming, entre otros, generan alteraciones en la colonización rizosférica; encontrándose que la ausencia de estos potenciales reduce drásticamente la capacidad de colonización del microorganismo (Beauregard et al., 2013; Dietel et al., 2013; Gao et al., 2016), además se han identificado moléculas que la planta produce o que hacen parte de su pared celular y que tienen un efecto en la mejora de la colonización por microorganismos de este género (Beauregard et al., 2013). En cuanto a sus patrones de colonización rizosférica, se han determinado que estos no siguen un comportamiento común en todas las plantas (Fan et al., 2012a; Knudsen & Dandurand, 2007), aunque si se ha encontrado que las zonas cóncavas de la superficie radical y las intersecciones de las raíz primaria con secundarias, son posibles rizodepósitos microbianos (Fan et al., 2012a). Adicionalmente, se reporta la detección de microorganismos de este género hasta por 15 DDI en plantas a nivel *in vitro*, empleando diferentes métodos como SEM, inserción de *gfp*, detección de genes reporteros como el LacZ ó DR5: GUS, entre otros, aunque no se ha diferenciado entre presencia de células vegetativas ó esporas (Dietel et al., 2013; Oslizlo et al., 2015; Ugoji et al., 2005).

En este estudio, se diseñó una sonda para FISH con variaciones en su extremo 5' para la detección y evaluación de la colonización de *B.subtilis* EA-CB00575 en la rizósfera de tomate y banano, se evaluó la colonización del microorganismo en diferentes sistemas de cultivo a nivel *in vitro* y en suelo, y se determinaron los patrones de colonización del

microorganismo en los cultivos evaluados. Este estudio es el primero en evaluar la interacción planta-*Bacillus* PGPR por medio del método de FISH y CARD-FISH, empleando una sonda específica para la especie *B. subtilis*, además es uno de los pocos trabajos de colonización reportados para microorganismos Gram positivos empleando métodos de hibridación *in situ*.

4.3 Metodología

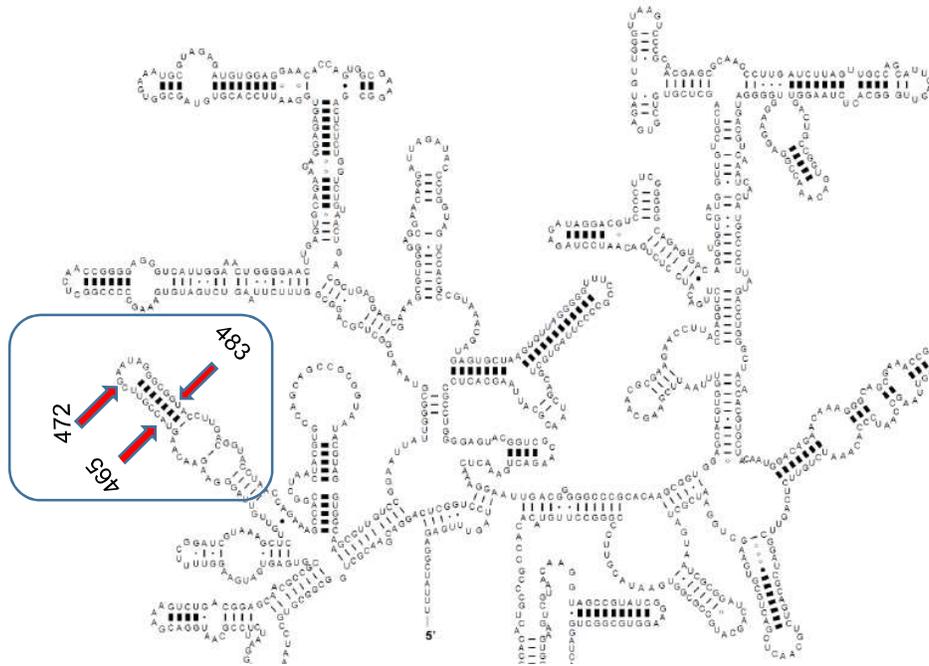
4.3.1 Diseño de una sonda específica para detección de *B.subtilis*

Para detectar la presencia del microorganismo *B. subtilis* EA-CB0575 en la rizósfera de cultivos de interés agrícola por medio del método FISH, se diseñó una sonda de DNA dirigida al 16s rRNA del microorganismo. Se empleó una comparación entre las secuencias del gen enunciado, para las especies *B. amyloliquefaciens* y *B. subtilis*, ambas pertenecientes al grupo de *B. subtilis* y con alta similitud a nivel genómico. Se detectaron secciones diferenciales entre las secuencias y se emplearon para el diseño de la sonda. En la Figura 4-1 se presenta el gen 16s rRNA de *B. subtilis* y se marca la zona empleada para el diseño de la sonda. Se determinó la secuencia que cubriera mayor cantidad de nucleótidos diferenciales y con ella, la secuencia complementaria, correspondiente a la empleada para el desarrollo de la sonda. Como criterios del diseño se emplearon los definidos por De Muro (2005): una longitud entre 18 - 50 pb, una composición de G-C entre 40 - 60%, no poseer regiones complementarias en la secuencia, no contener más de 4 repeticiones de la misma base y una temperatura de fusión de 57°C o mayor. Ante el cumplimiento de los requisitos se procedió a la evaluación de una sección de 22 nucleótidos (De Muro, 2005; Hugenholtz et al., 2002).

La sonda denominada Bsub-ss-0463-aA-22A según metodología de Alm et al (1996), se depositó en ProbeBase (Loy et al., 2007) y se fabricó en IDT (Integrated DNA Technology, Coralville, IA) con marcación en el extremo 5' usando fluoróforos. Para FISH se realizó la marcación con el fluoróforo 56-FAM (fluoresceína, λ de absorción/emisión 495nm/520 nm) para una de las versiones, y con Cy3 (cianina, λ de absorción/emisión 552 nm/565 nm) para otra. Para CARD-FISH se marcó el extremo 5' con HRP (Horse Radish Peroxidase). Las sondas se llevaron a una concentración de trabajo de 30 ng/ μ L cuando se empleó Cy3 y de 50 ng/ μ L cuando se empleó 56-FAM, la solución de las sondas de FISH se realizó

empleando buffer TE (10 mM Tris HCl, pH 7.2, 1 mM EDTA). Para la sonda marcada con HRP se empleó también una concentración de 50 ng/μL y se restituyó en agua ultrapura. Las sondas se almacenaron a -20 °C en oscuridad.

Figura 4-1. Sección del gen 16s rRNA de *B. subtilis* donde se reportan diferencias entre las secuencias de *B. amyloliquefaciens* y *B. subtilis* (Reva et al., 2004).



*Las flechas indican los nucleótidos diferenciales en esta sección del gen 16S (Posición 465: G cambia por A, 472: A cambia por G, 483: C cambia por T) entre *B. amyloliquefaciens* y *B. subtilis*, respectivamente rRNA (Reva et al., 2004).

4.3.2 Microorganismos y condiciones de cultivo

La cepa *B. subtilis* EA-CB0575 descrita en el capítulo 2 numeral 2.3.1, fue cultivada desde criovial en medio TSA (105458, Merck), una colonia del cultivo se llevó a medio TSB (105459, Merck) y permaneció en agitación a 150 rpm y 30°C por 24 h. Se evaluaron otros microorganismos para determinar la especificidad de las sondas en la hibridación (Tabla 4-1). Aquellos correspondientes a los géneros *Bacillus* y *Paenibacillus* se sembraron también en medio TSB, a las condiciones previamente enunciadas. *Azospirillum brasilense* Cd y *Micrococcus* M01 se sembraron en caldo nutritivo (105443, Merck) y se incubaron como los otros microorganismos por 48 h.

Tabla 4-1. Cepas empleadas en este estudio

Cepa	Especie	Fuente de aislamiento	Referencia
EA-CB009	<i>B. pumilus</i>		var. Gran Enano.
EA-CB0131	<i>B. cereus</i>		var. Valery.
EA-CB0158	<i>B. amyloliquefaciens</i>		<i>Musa balbisiana</i> (Plátano hartón).
EA-CB0575	<i>B. subtilis</i>		Var. Valery.
EA-CB0579	<i>B. gibsonii</i>		var. Gran Enano.
EA-CB0686	<i>B. altitudinis</i>	Rizósfera	var. Gran Enano.
EA-CB0784	<i>B. megaterium</i>		var. Valery.
EA-CB0959	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Urabá, Colombia	<i>Musa balbisiana</i>
EA-CB1121	<i>B. subtilis</i>	<i>Musa</i>	var. Gran Enano.
EA-CB0015	<i>B. subtilis</i>	AAA	var. Valery
EA-CB0840	<i>P. pasadenensis</i>	Filósfera	var. Valery
EA-CB0888	<i>P. pasadenensis</i>	Urabá Colombia	var. Valery.
168	<i>B. subtilis</i>	Cultivo de <i>B. subtilis</i> Marburg sometido a rayos-X. <i>Bacillus</i> Genetic Stock Center (BGCS, Universidad de Ohio, USA): 1A1.	(Zeigler et al., 2008)
AB-Cd1	<i>A. brasilense</i>	<i>Cynodon dactylon</i> . American Type Culture Collection (ATCC): 29710.	(Eskew et al., 1977)
ES4	<i>B. pumilus</i>	Cardon. La Paz, BCS, México. Número de acceso GenBank : FJ032017	(de-Bashan et al., 2010)
FZB42	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Suelo infestado, campo de remolacha azucarera. Brandenburg, Alemania. 10A6 del BGSC (Ohio University, USA)	(Fan et al., 2012b)
M01	<i>Micrococcus lylae</i>	Bacteria de mangle. La Paz, BCS, Mexico.	Colección de microorganismos, CIBNOR, Mexico.
MEG03	<i>B. megaterium</i>	Cardon. La Paz, BCS, Mexico.	
MP1AC4	<i>B. cereus</i>	Cardon. La Paz, BCS, Mexico.	(Holguin & Bashan, 1996)
NCTC-3610	<i>B. subtilis</i>	Aislada de sangre de un paciente con fenilcetonuria. Reportada por Ehrenberg, 1835. ATCC: 6051.	(Nakamura et al., 1999; Zeigler et al., 2008)

4.3.3 Sondas para FISH

Con el fin de evaluar la especificidad de la sonda diseñada y detectar el microorganismo de estudio en las muestras de raíces se empleó el método de FISH. Para ello se usó la sonda Bs575, con variaciones en la marcación en su extremo 5' (56-FAM, Cy3 ó HRP). También se empleó la mezcla equimolar de las sondas EUB338, EUB338 II y EUB338III (EUBMix) para la detección general de eubacterias (Daims et al., 1999) y la sonda NON338 como control negativo de hibridación (Wallner et al., 1993), todas marcadas en su extremo 5' con el fluoróforo Cy3.

4.3.4 Preparación y fijación de las muestras de cultivos puros

Las células bacterianas de los cultivos evaluados se centrifugaron a 3250 g por 15 min. Los sobrenadantes se descartaron y la biomasa obtenida se lavó dos veces con solución salina 0,85%. La densidad óptica se ajustó a 1,0 (correspondiente a $\sim 10^8$ UFC/mL para las cepas de *Bacillus*, *Paenibacillus* y *Micrococcus* y $\sim 10^9$ UFC/mL para *A. brasilense*). Los conteos se verificaron por el método de plateo por superficie en TSA y agar nutritivo (105450, Merck), respectivamente. Las células Gram positivas se fijaron empleando una solución de 500 μ L 0,85% NaCl y 500 μ L de etanol al 96% a 4 °C. Las células Gram negativas se fijaron en paraformaldehído al 4% (158127, Sigma-Aldrich) y se incubaron por 3 h a 4 °C. Diez μ L de las células Gram positivas fijadas y 4 μ L de las Gram negativas se adicionaron a placas portaobjetos previamente gelatinizadas (0,1% w/v gelatina [G2500, Sigma-Aldrich] y 0,01% w/v de sulfato cromo-potasio [243361, Sigma-Aldrich]). Las muestras en placa se deshidrataron por sumersiones sucesivas en etanol 50, 80, and 96% por 3 min en cada solución, y se secaron a 37 °C. Para la permeabilización de las células Gram positivas se empleó lisozima (10 mg/mL, L-7651 Sigma-Aldrich,) y las muestras se incubaron a 37°C por 20 min, para posteriormente deshidratarlas como se describió previamente; y finalmente secarlas a 37°C. Una vez preparadas, se almacenaron a 4°C hasta la hibridación.

4.3.5 FISH de muestras de raíces provenientes de cultivos de tomate y banano a nivel *in vitro* o en suelo

▪ Preparación de raíces que no requieren corte en micrótopo

Con el fin de detectar la presencia del microorganismo PGPR en las raíces principales de tomate o de banano se procedió a separar las raíces completas del sustrato (suelo,

vermiculita, medio MS_(s) ó MS_(L)) y se lavaron con NaCl 0,85%. Posteriormente se fijaron con 500 μ L de etanol 96% y 500 μ L de NaCl 0,85%, y se llevaron a 4°C por 2 h. Para tomate se tomó la raíz primaria y para banano se seleccionó una raíz principal central más joven y larga, y se fijaron con agarosa 0,25% a 65°C en las placas previamente gelatinizadas. Las placas se secaron a 37°C por 15 min y posteriormente se realizó el proceso de deshidratación a 50, 80 y 96% como se explicó previamente para células Gram positivas, seguido por la aplicación de lisozima y una nueva deshidratación.

▪ **Preparación de raíces que requieren corte en micrótopo**

Algunas de las raíces que se requerían visualizar tenían un diámetro superior al sugerido para una adecuada observación (mayor a 1 mm de diámetro). Por este motivo se realizaron cortes con micrótopo para raíces de banano y ultramicrótopo para semillas de tomate. En banano, las muestras de raíces se fijaron en etanol al 96% y NaCl 0,85% por 2 h y se dejaron en etanol al 96% por 24 h a 4°C. Posteriormente se llevaron a un procesador de tejidos (LEICA, TP1020) donde se realizó una inmersión automática de las muestras en gradiente de alcohol isopropílico, xilol y parafina con el fin de realizar la preparación para la inclusión. Posteriormente, las muestras se llevaron a cassettes de inclusión con Paraplast (Leica, 39603002) y se realizaron los cortes en un micrótopo Leica RM2125 RTS (Universidad de Antioquia, Laboratorio de Patología, Medellín, Colombia) a un espesor de 15 μ m. En tomate, este proceso se realizó a las semillas del tiempo inicial de inoculación debido a la dureza e irregularidad de su superficie. Las semillas recién inoculadas se embebieron en la resina Technovit H8100 (14654, EMS), según protocolo recomendado por el fabricante y posteriormente se realizaron cortes de la muestra a 10 μ m de espesor empleando el ultramicrótopo (EM-UC7 LEICA, del laboratorio de TEM en la SIU de la Universidad de Antioquia, Colombia). Los cortes resultantes para ambas plantas se llevaron a un baño de agua tibia y se procedió al montaje en placas cargadas (2645, Ossalud). Estas placas se calentaron a 65°C por 1 h y posteriormente se llevaron a un baño de xilol por 10 min. Se repitió la inmersión en xilol limpio y posteriormente se realizó una rehidratación de la muestra pasando por etanol al 96, 80 y 70% por 3 min en cada solución. Se realizó la aplicación de lisozima e incubación por 20 min a 37°C para posteriormente deshidratar en 50, 80 y 96% de etanol por 3 min y secar a 37°C.

4.3.6 Hibridación de fluorescencia *in situ* (FISH)

Para la hibridación se preparó un buffer compuesto de 360 μL 5M NaCl, 40 μL 1 M Tris-HCl (10812846001, Sigma-Aldrich) a pH 8,0; 2 μL 10% SDS (0227, Amresco); 700 μL de formamida desionizada (F9037, Sigma-Aldrich) y 900 μL de agua ultrapura. La cantidad de formamida adicionada y agua dependió de la astringencia de la sonda (en este caso 35%). Para la hibridación se adicionó a cada muestra 40 μL del buffer, 4 μL de EUBmix y 10 μL de la sonda Bs575 (si estaba marcada con FAM). Cuando se aplicó la sonda Bs575 marcada con Cy3 (5 μL) no se aplicó la sonda EUBmix debido a la imposibilidad de contraste. Todo el proceso se desarrolló en oscuridad para reducir el blanqueamiento de la muestra. Las placas se colocaron en tubos Falcon de 50 mL con una pieza de papel toalla impregnada de buffer de hibridación remanente (cámaras de hibridación) y se llevaron a un horno de hibridación (model 5430, VWR International, USA) a 46°C por 2 h. Posteriormente las placas se lavaron con un buffer compuesto por 1 mL 1M Tris-HCl a pH 8,0; 500 μL 0,5M EDTA (0105, Amresco) a pH 8,0; 700 μL 5 M NaCl (de acuerdo a la astringencia de 35%); 50 mL de agua ultrapura y 50 μL de 10% SDS. Los tubos con el buffer se precalentaron a 48°C en baño María y las placas se sumergieron en los tubos por 15 min. Posteriormente las placas se lavaron con agua desionizada a 4°C y se secaron en oscuridad a temperatura ambiente. Los experimentos fueron realizados dos veces en tiempos independientes y se emplearon dos repeticiones de cada muestra por cepa.

4.3.7 CARD-FISH (Catalyzed Reporter Deposition)

Con el fin de mejorar la detección de *B. subtilis* EA-CB0575 en las raíces de tomate y banano debido a la autofluorescencia de las raíces, se procedió al uso de la metodología de CARD-FISH empleando el protocolo original de Teira y colaboradores (2004) con modificaciones. La sonda empleada fue la previamente diseñada (Bs575 como nombre corto y Bsub-ss-0463-aA-22A según nomenclatura de las sondas), a la cual en lugar de fluorocromo se le realizó una marcación en el extremo 5' con la enzima Horse Radish Peroxidase (HRP). Una vez se hibridó la muestra, se procedió a la amplificación de la señal de hibridación por medio de la reacción de la HRP y una tiramida conjugada con un fluorocromo, lo que permite aumentar la señal fluorescente. Se emplearon las tiramidas conjugadas con los fluorocromos succinimidil-éster Atto-488 (41051, Sigma) con emisión en el verde (λ Absorción: 501 nm y λ emisión: 523 nm.) ó Biotium555 (Biotium, Freemon, CA) con emisión

en el rojo (λ Absorción: 555 nm y λ emisión: 565 nm.), según requerimientos de la muestra. La síntesis de la tiramida se realizó según el protocolo original enunciado y, según el fluorocromo a emplear. El proceso de fijación de la muestra se realizó como se enunció para FISH (numeral 4.3.4). La permeabilización e inactivación de peroxidasas se realizó según lineamientos del protocolo. Para la hibridación se realizaron las siguientes modificaciones: se empleó un buffer de hibridación compuesto por dextran sulfato 10% (D8906, Sigma); NaCl 5M 1,8 μ L; Tris-HCl 1 M 200 μ L; Tritón X-100 (T8787, Sigma) 5 μ L; formamida desionizada 5,5 mL; Blocking Reagent 10% 1 mL (buffer de ácido maléico 100 mM; NaCl 150 mM; pH 7,5 y 10% Boehringer Mannheim blocking reagent -Roche, Nr 1096196- disueltos hasta 100 mL con ADE a 60°C) y 1,5 mL ADE. Este buffer se adicionó a las muestras en mezcla de 1 parte de sonda-HRP con 20 partes de buffer, cubriendo toda la muestra, y se incubaron en cámara de humedad a 35°C por 15 h en oscuridad. Pasado este tiempo se lavaron las placas de la siguiente manera: Se preparó un buffer compuesto por 700 μ L de NaCl 5M; 1 mL de Tris-HCl 1M pH 8,0; 500 μ L de EDTA 0,5M pH 8,0; 50 mL de agua ultrapura y 50 μ L de SDS 10%. Este buffer se calentó a 37°C en tubos Falcon al baño María y se sumergieron las muestras en las placas por un período de 15 min. Posteriormente las placas se secaron a temperatura ambiente y se procedió a la amplificación de la señal. Para la amplificación de la señal se procedió según el protocolo, pero aumentando el tiempo de incubación de las placas en el buffer de amplificación a 30 min y a 37°C, para posteriormente proceder a los lavados finales según el mismo procedimiento (Teira et al., 2004).

4.3.8 Visualización de las muestras

La visualización de las muestras se realizó aplicando dos gotas de citifluor AF-1 (19440, Electronic Microscopy Sciences EMS, Hatfield, PA,) tanto a las muestras de FISH, como a las de CARD-FISH, y en los casos que se requería determinar los microorganismos totales por tinción, se aplicaron dos gotas de DAPI (R37606, Life Technologies) cubriendo completamente la muestra y se incubaron a 20°C por 15 min. La visualización se realizó en los microscopios AxioScope A.1 Zeiss en la Universidad EAFIT, Medellín, Colombia ó en el Olympus BX41 en el CIBNOR, La Paz, México; empleando el objetivo 100X y usando el aceite de inmersión para fluorescencia 518 F(444960, Carl Zeiss). Las muestras se observaron en los filtros DAPI, FITC y Cy3, de acuerdo a los fluoróforos empleados. El procesamiento de las imágenes de microscopía de fluorescencia se realizó en el software

Zen 2013 (Blue edition, Carl Zeiss) ó en ImagePro Plus 6,3 (Media Cybernetics, Silver SpringMD). Algunas de las muestras de raíces con 15 DDI se visualizaron en el microscopio confocal láser Olympus FV1000 (Universidad de Antioquia, Facultad de Biología) empleando los filtros Cy3, FITC y DAPI. Las muestras del confocal fueron procesadas empleando el FV10-ASW 2.1 Viewer.

4.3.9 Evaluación de crecimiento e hibridación de *B.subtilis* EA-CB0575 en cultivos puros y raíces de banano y tomate en el tiempo

Con el fin de determinar la presencia de *B.subtilis* EA-CB0575 se empleó el método FISH en diferentes tiempos del cultivo en medio TSB ó SBM. Adicionalmente se determinó el crecimiento celular por densidad óptica ($\lambda=600$ nm) tomando muestras cada 4 h durante las primeras 24 h y posteriormente cada 12 h hasta las 96 h de cultivo. Esta evaluación se replicó en dos tiempos independientes para validar los resultados. Para determinar la presencia de *B.subtilis* EA-CB0575 en las raíces de tomate y banano en el tiempo, se inocularon las semillas de tomate/plántulas de banano con las esporas ó células vegetativas del microorganismo a 1×10^8 UFC/mL, y se procedió a la siembra en medio MS_(s) como se enunció en los numerales 3.3.4 y 3.3.5 del capítulo 3. Se tomaron muestras de las semillas ó raíces de tomate y de las raíces de las plántulas de banano cada 5 días durante un mes; y se procedió a la fijación de la raíz principal en el caso de tomate, y de una raíz principal central en el caso de banano. Posteriormente se realizó el FISH ó CARD-FISH. Para las raíces de banano se realizó el procesamiento del tejido e inclusión en parafina, actividades que permiten el corte de las muestras en micrótopo, como se enunció en el numeral 4.3.5. Una vez cortadas, las muestras se desparafinaron y se procedió a la permeabilización de las membranas, deshidratación e hibridación de las muestras.

Se realizó también la evaluación de la colonización del microorganismo en las plantas de tomate o banano sembradas en diferentes sustratos; MS_(s), MS_(L), vermiculita, suelo con alta cantidad de materia orgánica y suelo con baja cantidad de materia orgánica (ver detalles en capítulo 3 numerales). En el caso del sustrato vermiculita, que no había sido evaluado en otras partes del proyecto, se emplearon 100 mL de vermiculita estéril (Antiguo Mas Moderno, Cundinamarca) con 50 mL de medio MS_(L). Las raíces de las plantas en los diferentes sustratos se emplearon para la hibridación como se explicó previamente. En este caso se emplearon plantas de 15 DDI.

Para determinar los patrones de colonización de *B. subtilis* EA-CB0575 en las raíces de plantas de tomate y banano, se realizaron evaluaciones por medio de CARD-FISH a las raíces principales a los 15 DDI en medio $MS_{(s)}$ y $MS_{(L)}$. Estas raíces se seccionaron en las tres partes, con el fin de alcanzar a seleccionar parte de cada una de las zonas que componen la raíz: zona de maduración, zona de elongación y zona de diferenciación celular. Cada una de las raíces evaluadas se midió desde la base de la raíz hasta la punta y se realizaron cortes desde la base hasta el primer tercio de su longitud (sección superior), desde el segundo tercio hasta inicio del tercer terco de su longitud (sección media) y desde el inicio del último tercio a la punta (sección inferior). La presencia de microorganismo en estas secciones se determinó por medio de microscopía de fluorescencia. Se empleó la tiramida roja en ambos cultivos debido a un mayor contraste en la raíz, y se realizó la tinción con DAPI. La superposición de las imágenes generó células fucsia, correspondientes a aquellas teñidas con DAPI y que además hibridaron con la sonda /HRP/-Bs575. En azul se observaron las células presentes en la muestra que no hibridaron con la sonda. Se tomaron 10 secciones de la parte porción superior de diferentes plántulas con el mismo tratamiento, 10 de la parte media y 10 de la parte inferior; se hibridaron y visualizaron en el microscopio de fluorescencia en los filtros Cy3 y DAPI.

4.3.10 Visualización de muestras por SEM (Scanning Electronic Microscopy)

Las muestras de raíces tratadas y sin tratar con *B. subtilis* EA-CB0575, fueron visualizadas por medio de SEM. Para ello se realizó una fijación de las muestras en 2,5% de glutaraldehído en buffer fosfato 0,1 M pH 7,4 por 2 h, luego de este proceso las muestras se lavaron dos veces con buffer y se sometieron a una deshidratación gradual en 20, 40, 60, 70, 80 y 100% de etanol por 40 min en cada solución. La deshidratación en 100% de etanol se realizó dos veces consecutivas. Luego de deshidratar, las muestras se sometieron a secado supercrítico (Tousimis modelo Samdri-PVT 3B) y se recubrieron con una mezcla de oro/paladio antes de la visualización en el Scanning Electron Microscope (Hitashi 300 HT77 10 120 KV en La Paz, México ó en el FEI Quanta 250 de la Universidad de Caldas, Manizales, Colombia).

4.3.11 Evaluación de poblaciones totales recuperadas de las raíces en el tiempo

Se realizaron evaluaciones de las poblaciones totales cultivables presentes en las raíces de banano cada 10 días. Para ello se tomaron 5 g de raíces con 45 mL de buffer fosfato pH 7,4 y se maceraron en un Ultraturrax IKA 20 W por 10 min a 2000 rpm. La suspensión resultante se empleó para siembra por superficie por medio de diluciones seriadas. Se sembraron 100 μ L de las diluciones entre 10^{-3} - 10^{-6} en TSA X 0,5 y los resultados se reportaron en UFC/mL.

4.4 Resultados

4.4.1 Bs575 es una sonda de FISH específica para la especie *B. subtilis*

Con el fin de diseñar una sonda específica para la detección de microorganismos de la especie *B. subtilis* se identificaron secciones diferenciales en el gen 16S rRNA de los microorganismos *B. amyloliquefaciens* y *B. subtilis*, cercanos filogenéticamente. Se diseñaron varias versiones de la sonda, con diferentes marcaciones en su extremo 5', las cuales se emplearon para la detección del microorganismo en diferentes ambientes (Tabla 4-2). En primera instancia la sonda se empleó para hibridar el cultivo puro de la cepa EA-CB0575 en TSB y se observó una alta fluorescencia (Anexo VI). Se evaluó la autofluorescencia de las células y se determinó que las células vegetativas no presentan autofluorescencia; indicando que la emisión de fluorescencia se debe a la hibridación con la sonda complementaria. Las esporas autofluorescieron luego del tratamiento con el buffer de hibridación y sin presencia de la sonda, indicando que poseen algún compuesto que emite fluorescencia a la λ de trabajo (Anexo VI). Con el fin de evaluar la especificidad de la hibridación con la sonda Bs575 se realizaron cultivos de microorganismos de diferentes especies del género *Bacillus* y algunas especies filogenéticamente alejadas, empleando las sondas /56-FAM/-Bs575 y EUBMix (Figura 4-2).

Se observan en primer lugar las hibridaciones de las cepas con la sonda /56-FAM/-Bs575 (columna de la izquierda), una hibridación exitosa con esta sonda presenta alta fluorescencia verde. Para las cepas evaluadas sólo se encontró hibridación con la especie

B. subtilis (cepas 168, NCTC 3610, EA-CB0015, EA-CB0575 y EA-CB1121). La sonda no presentó hibridación con las cepas de especies filogenéticamente cercanas a *B. subtilis* como *B. amyloliquefaciens*, lo que sugiere que es específica no a nivel de cepa sino a nivel de especie. En la columna del medio se presenta la hibridación con la mezcla de sondas universales EUBMix 338, presentándose una hibridación exitosa de las células de todas las cepas evaluadas (fluorescencia roja), lo que indica que todas pertenecen al dominio Eubacteria (Daims et al., 1999). La superposición de las hibridaciones en con /56-FAM/Bs575 y con EUBMix, se presentan en la columna de la derecha. Se observa fluorescencia amarilla para las células que hibridaron con ambas sondas, lo cual sólo se presentó en las cepas de *B. subtilis* evaluadas.

Tabla 4-2. Parámetros de la sonda diseñada para la detección de *B. subtilis*.

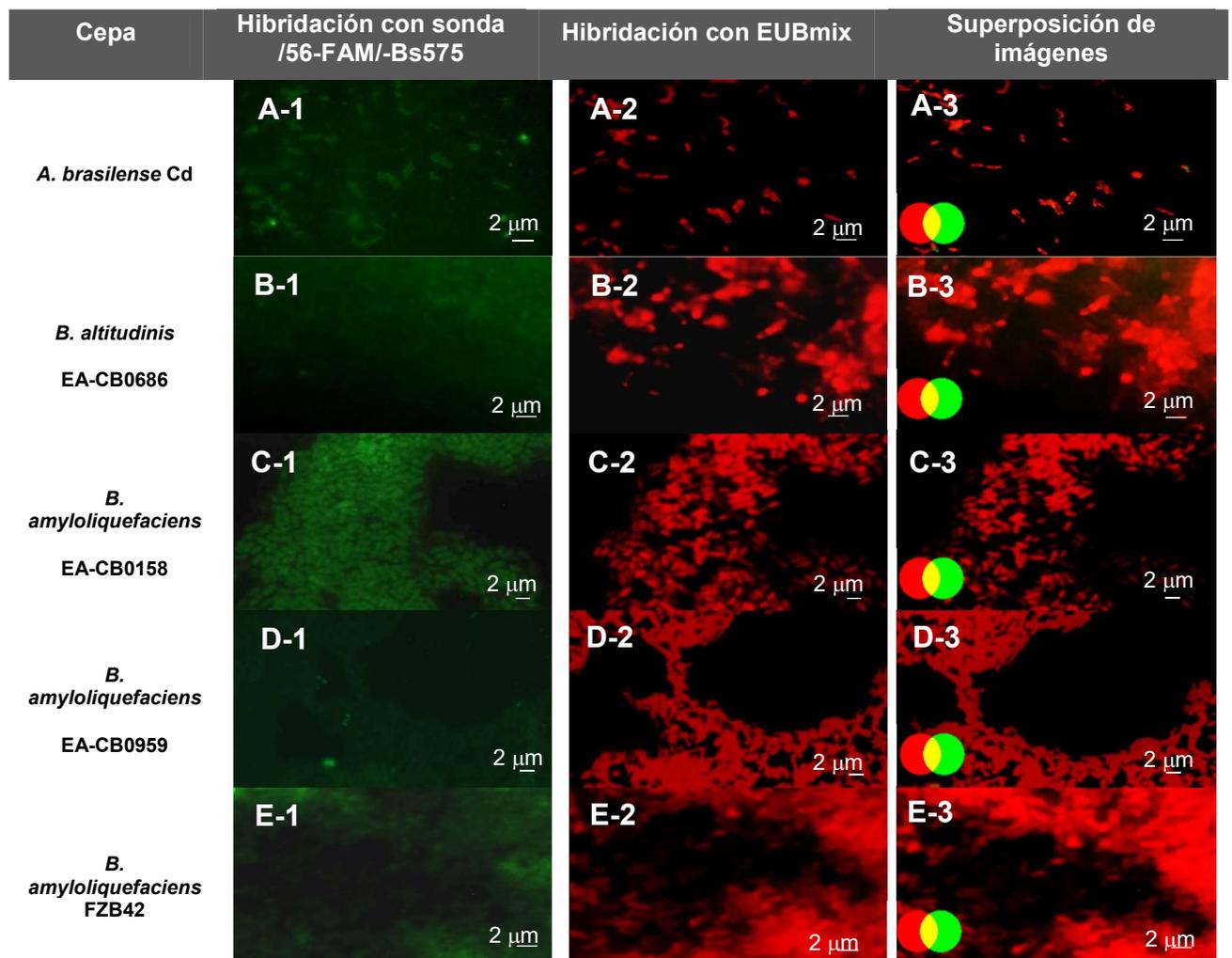
Sonda Bs575			
Secuencia	5'-TACCGCCCTATTCGAACGGTAC-3'		
Tamaño	22 pb		
Nombre según normatividad (Alm et al., 1996)	Bsub-ss-0463-aA-22 ^a		
Zona complementaria	5'-GTACCGTTTCGAATAGGGCGGTA-3'		
Temperatura de fusión	68°C		
% G-C	54,54%		
Marcación en extremo 5'	FAM	disponible	7192,8
	Alexa488	Disponible	7351,0
	Cy3	Disponible	7161,2
	HRP	Disponible	6655,0
		Peso molecular (g/mol)	

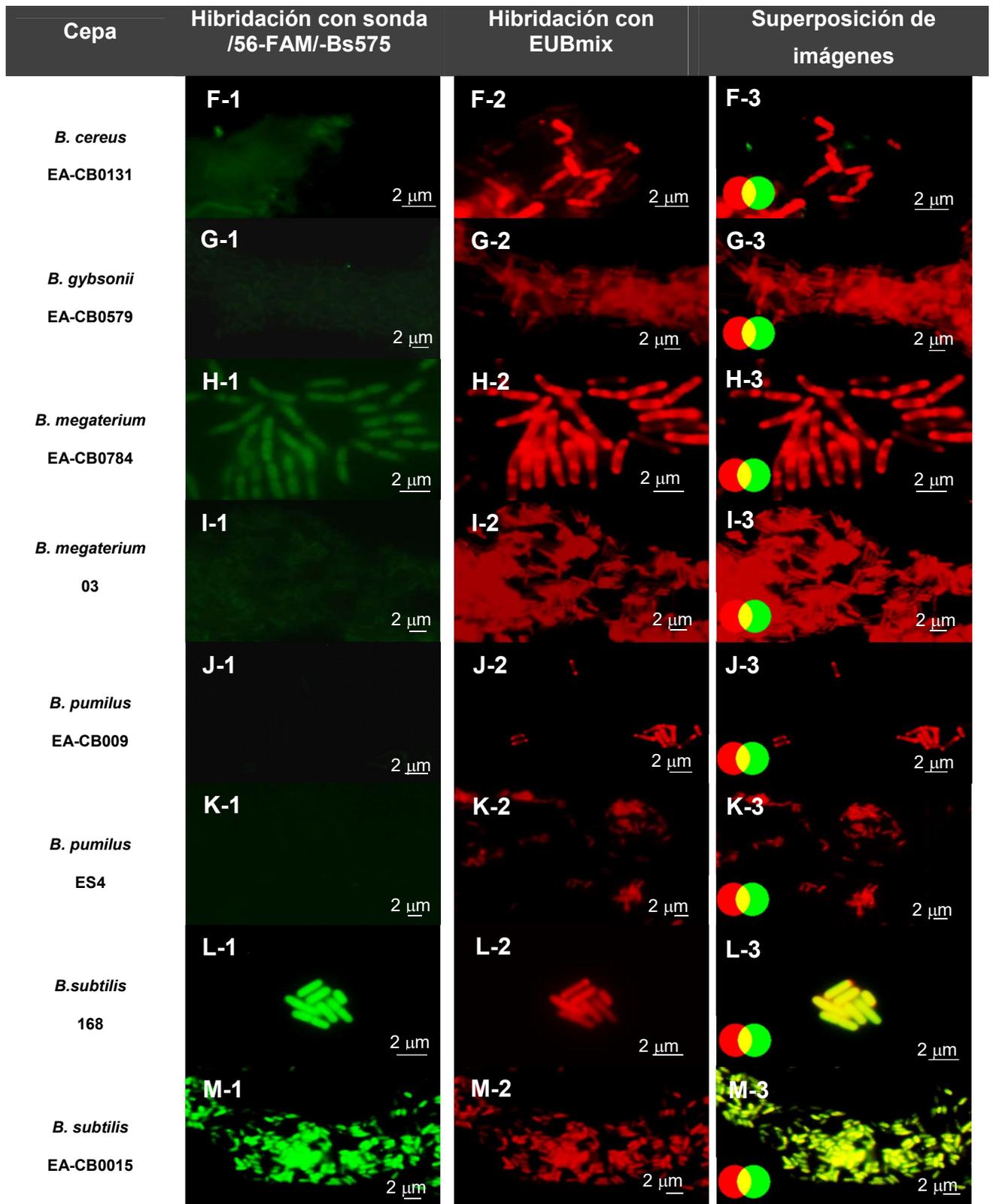
*La versión de la sonda marcada en 5' con Alexa488 se empleó una vez al agotarse la sonda marcada con 56-FAM. En los procesos donde se aplicó /56-FAM/-Bs575 también puede aplicarse /Alexa488/-Bs575.

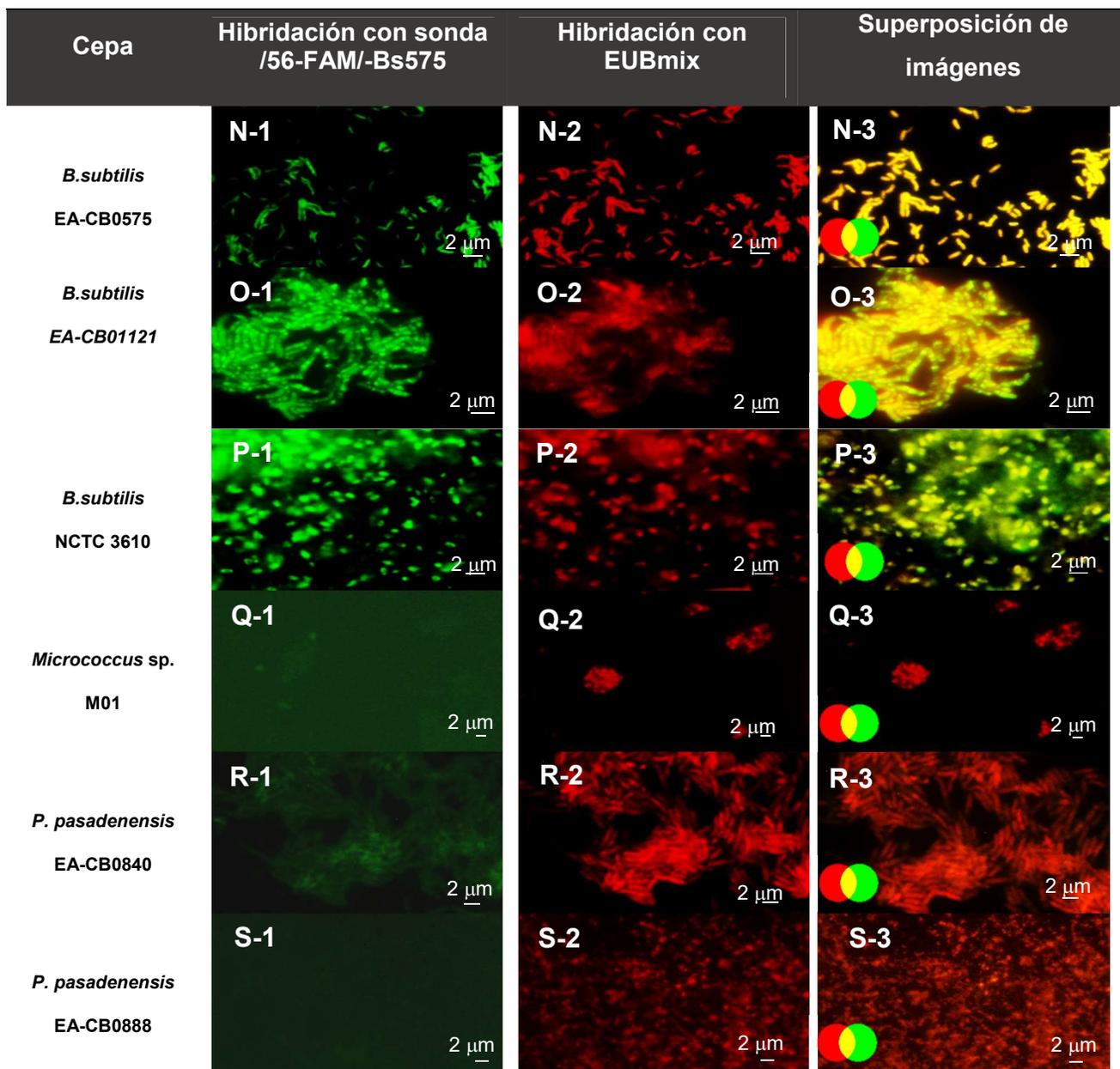
En algunas de las imágenes presentadas se aumentó la fluorescencia de las células hibridadas con /56-FAM/-Bs575 para observar la presencia de células (Figura 4-2 imágenes A-1 hasta K-1 y Q1 a S1). Con el fin de determinar si existen cambios en la hibridación de la sonda con *B. subtilis* EA-CB0575 en el tiempo se realizó una evaluación para monitorear la fluorescencia de las células (Anexo VI). Se determinó que las células producidas en medio TSB (vegetativas) tienen una hibridación homogénea con la sonda entre los tiempos

0-24 h, y a partir de las 36 h se observa que la fluorescencia se concentra en los polos de las células, lo cual podría deberse al proceso de esporulación (Wu & Errington, 2002). Se evaluó también la hibridación de la sonda con las esporas del microorganismo producidas en medio SBM (Anexo VI). Se observó inicialmente la presencia de células vegetativas (células alargadas de 1,5-1,8 μm) con una hibridación homogénea en las primeras horas. Sin embargo, a partir de las 24 h se observa una hibridación heterogénea con espacios vacíos en la célula, y posteriormente se da la aparición de estructuras ovoides con una alta autofluorescencia. Estas estructuras podrían ser esporas debido a su tamaño celular (0,8–1,2 μm para esporas y entre 1,5 – 2,0 μm para células vegetativas).

Figura 4-2. Hibridación de la sonda /56-FAM/-Bs575 con diferentes especies del género *Bacillus* y grupos filogenéticamente distantes.



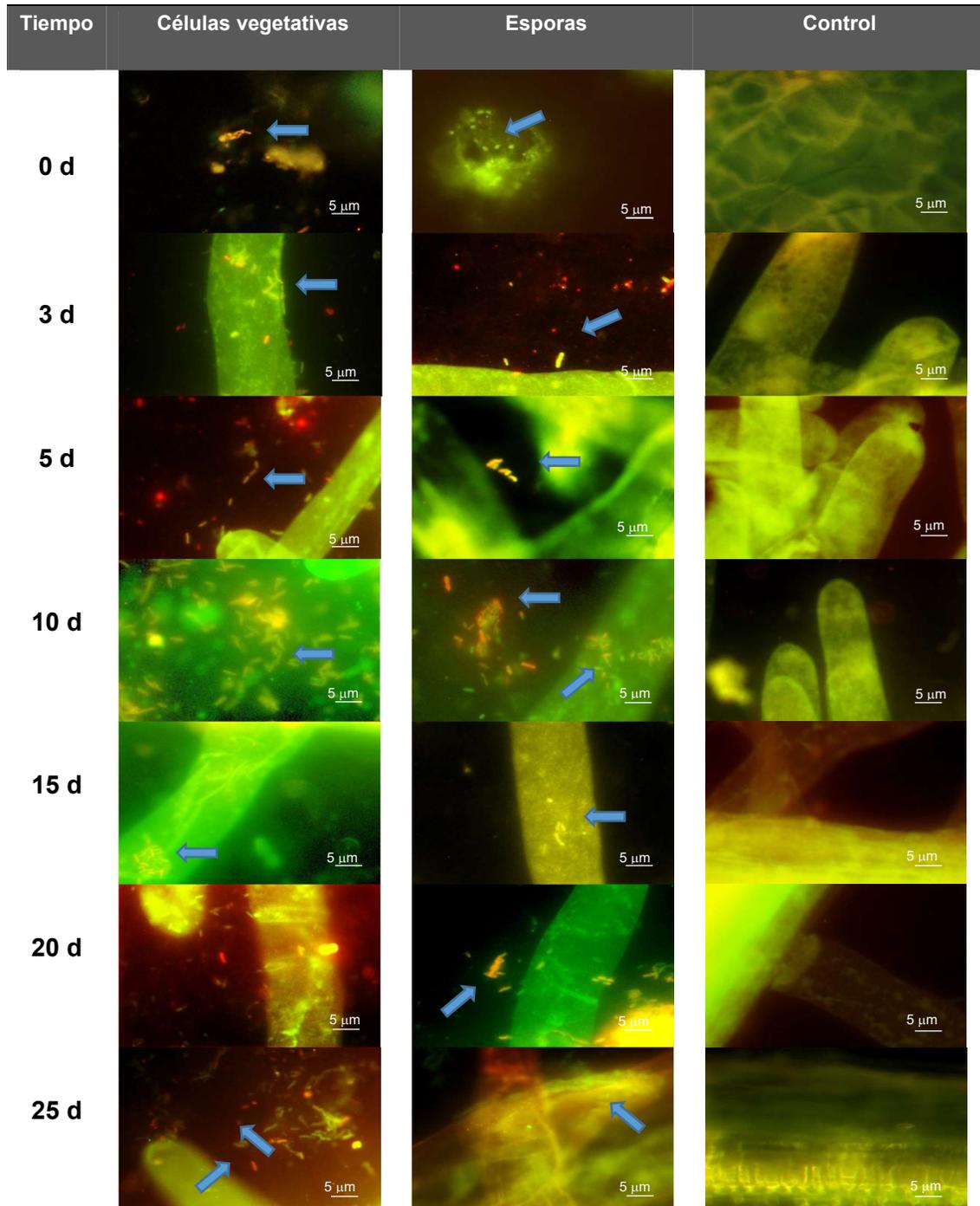


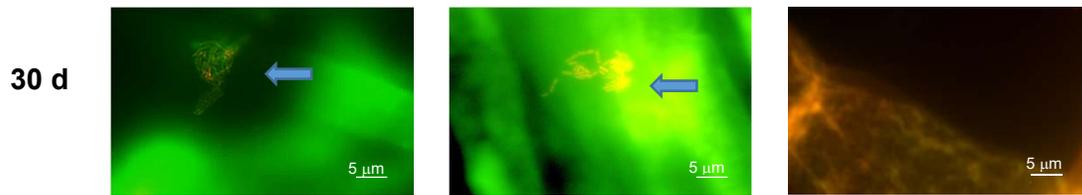


4.4.2 *B.subtilis* EA-CB0575 coloniza la raíz de plántulas de tomate

Para determinar la capacidad de *B.subtilis* EA-CB0575 para colonizar la raíz de plántulas de tomate se realizaron evaluaciones en diferentes tiempos (entre 0 y 30 DDI) y se emplearon las metodologías de detección FISH y CARD-FISH aplicadas a raíces principales con los diferentes tratamientos. Se realizó además SEM para raíces principales de cada tratamiento a los 30 DDI.

Figura 4-3. Detección de *B.subtilis* EA-CB0575 en raíces de tomate por FISH entre 0-30 DDI.



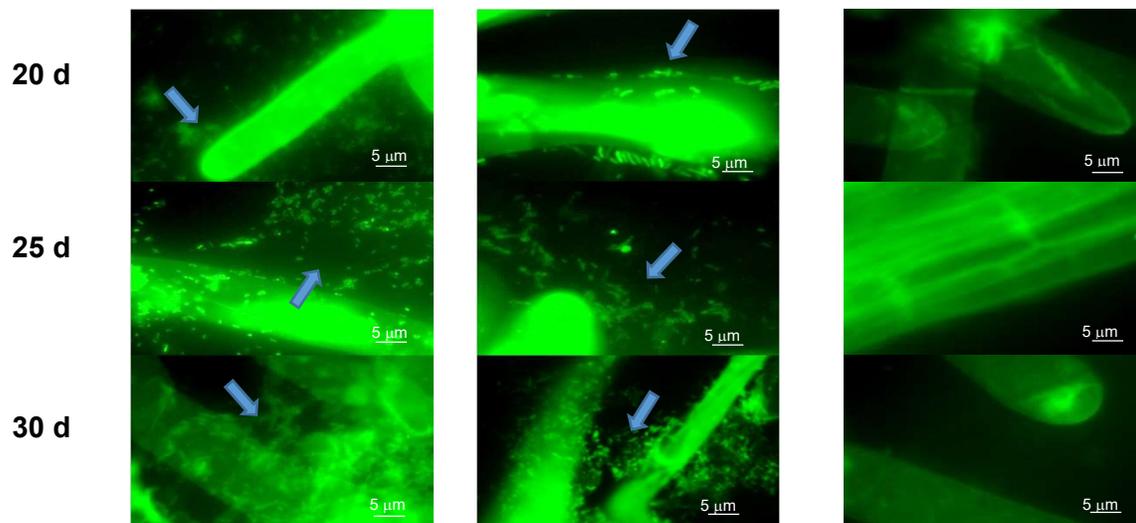


*Las flechas azules denotan las zonas con mayor presencia de los microorganismos. Se emplearon semillas de tomate var. Chonto desinfectadas superficialmente, sembradas en medio MS_(s) con agar al 5%. Las raíces presentadas son raíces primarias, en las que además se encuentran pelos radiculares. Las semillas germinaron al día 3 y se realizaron las observaciones en el hipocótilo. Se empleó la sonda /56-FAM/-Bs575 para la hibridación con *B.subtilis*, la sonda EUBmix para hibridación de eubacterias y las fotografías presentadas corresponden a la superposición de las imágenes de cada sonda. Células en amarillo corresponden a *B.subtilis* que hibridaron con la sonda específica y con la sonda universal.

En vista de la alta autofluorescencia de las raíces se decidió emplear CARD-FISH para aumentar la intensidad de la señal fluorescente. Se evaluó la colonización del microorganismo desde 0 hasta 30 DDI (Figura 4-4).

Figura 4-4. Detección de *B.subtilis* EA-CB0575 en raíces de tomate entre 0 y 30 DDI por CARD-FISH

Tiempo	Células vegetativas	Esporas	Control
0 d			
3 d			
5 d			
10 d			
15 d			



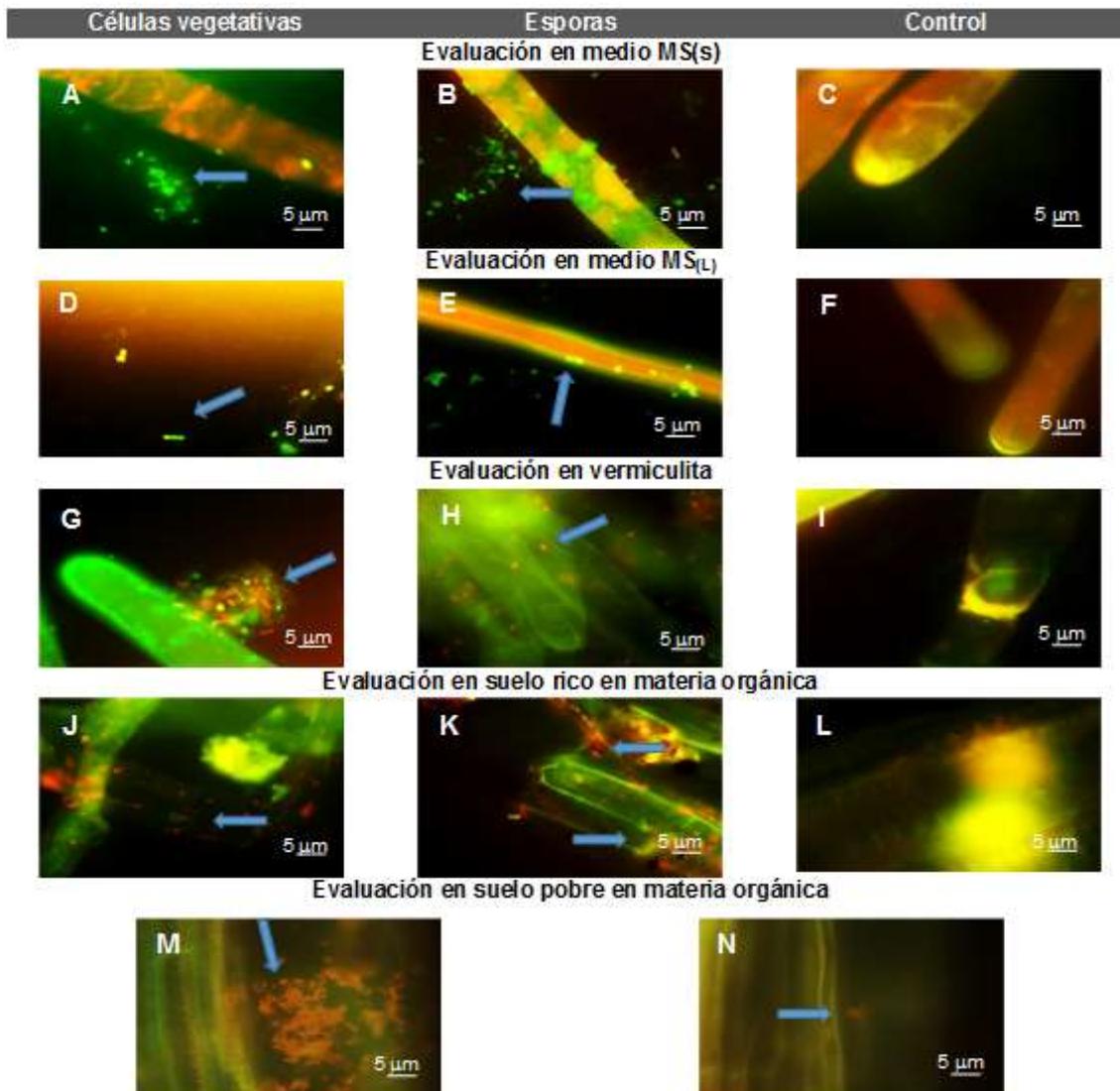
*Las flechas azules denotan las zonas con mayor presencia de los microorganismos. Se emplearon semillas de tomate var. Chonto desinfectadas superficialmente, sembradas en medio $MS_{(S)}$ con agar al 5%. Las raíces son raíces primarias en las que además se presentan pelos radiculares. Las semillas germinaron al día 3 y se realizaron las observaciones en el hipocótilo. Se empleó la sonda /HRP/-Bs575 para la hibridación el *B. subtilis*, se realizó la amplificación de la señal empleando tiramida con emisión en el verde (λ absorción: 501 nm y λ emisión: 523 nm.). Las imágenes presentan en verde las células de *B. subtilis*.

Inicialmente se encontró una baja presencia de microorganismos en las raíces, lo cual fue aumentando con el tiempo, observando mayor cantidad de células a partir de los 10 DDI. Sugiriendo un aumento de la población en el tiempo, lo que indicaría colonización del microorganismo en la rizósfera de la planta. Se observa además la formación de aglomerados celulares en los tratamientos con la presencia del microorganismo, lo cual sugiere la producción de exopolisacáridos que mantienen las células unidas entre ellas. En el tratamiento con aplicación de esporas se observó en el tiempo inicial la presencia de células circulares con alta fluorescencia, similares a las esporas, previamente evaluadas por hibridación de cultivos puros (Anexo VI). Sin embargo, a partir de los 3 DDI (en el ensayo de FISH) y de los 5 días (por CARD-FISH), se encontraron células alargadas similares a células vegetativas, indicando una posible germinación de las esporas en la raíz. El tratamiento con células vegetativas presentó formas bacilares en la raíz durante el tiempo de evaluación pero también se encontraron algunas estructuras similares a esporas en las raíces evaluadas (datos no mostrados). Esto sugiere que las células permanecen activas y sólo una porción entra en proceso de esporulación.

Con el fin de determinar si existen diferencias en la colonización de las raíces de tomate en diferentes medios de crecimiento, se evaluó la presencia del microorganismo cuando se aplicó en forma de esporas o de células vegetativas a semillas de tomate que

posteriormente se sembraron en los medios $MS_{(s)}$, $MS_{(L)}$, vermiculita, suelo con alta cantidad de materia orgánica y en suelo con baja cantidad de materia orgánica (Figura 4-5). Se observó la presencia de microorganismos *B. subtilis* en los tratamientos con inoculación en diferentes medios de crecimiento. El control no presenta células fluorescentes en la mayoría de las imágenes (Figura 4-5 C, F, I, L), indicando ausencia de la especie *B. subtilis*.

Figura 4-5. Colonización de *B. subtilis* EA-CB0575 en la raíz principal de plántulas de tomate en diferentes sustratos de crecimiento a los 15 DDI.

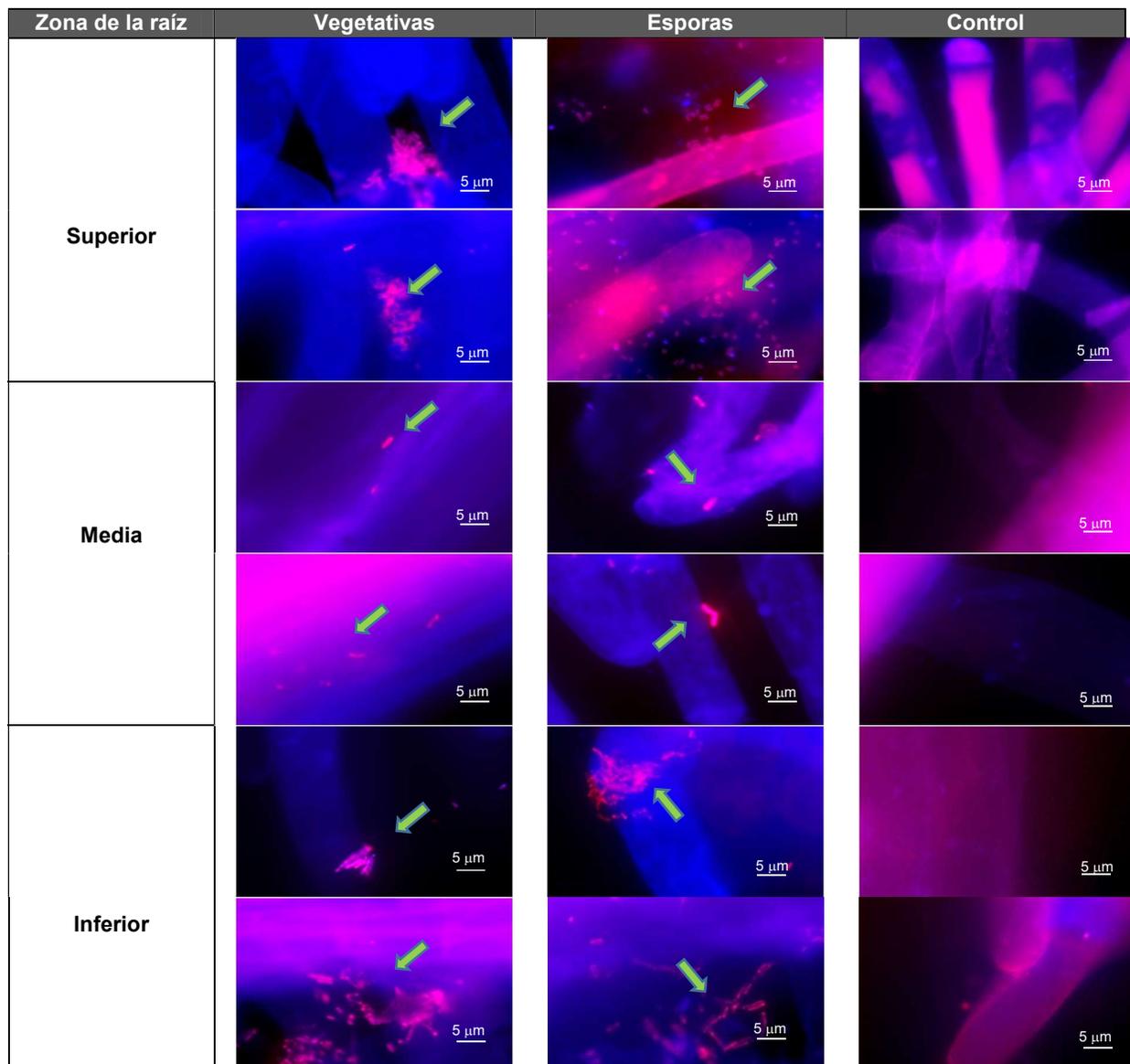


*Las flechas azules denotan las zonas con mayor presencia de los microorganismos. Se emplearon semillas de tomate var. Chonto desinfectadas superficialmente. Las raíces presentadas son raíces primarias en las que se presentan también pelos radiculares. Para las imágenes de A-F se empleó CARD-FISH con la sonda /HRP/Bs575 y la amplificación se realizó empleando tiramida de emisión en el verde (λ absorción=501 nm y λ emisión=523 nm) (*B. subtilis* fluoresce en verde). Las imágenes de G-L se realizaron empleando CARD-FISH

con tiramida roja (λ Absorción: 555 nm y λ emisión: 565 nm) debido a una alta autofluorescencia en el filtro FITC del suelo y de vermiculita, los cuales quedan adheridos a la raíz (*B.subtilis* fluoresce en rojo). Para las imágenes **M** (raíces de tomate con aplicación de células vegetativas) y **N** (raíces sin aplicación de microorganismos) se empleó FISH con la sonda Bs575-Cy3 (*B.subtilis* fluoresce en rojo).

Sin embargo, en la Figura 4-5N, se observa presencia de un par de células adyacentes a la raíz, revelando la presencia de microorganismos de la especie *B.subtilis* en estos medios, aún sin la aplicación de la rizobacteria de interés. Con el fin de determinar la zona donde se aloja los microorganismos en la raíz, se evaluaron los patrones de colonización del microorganismo para la planta de tomate (Figura 4-6).

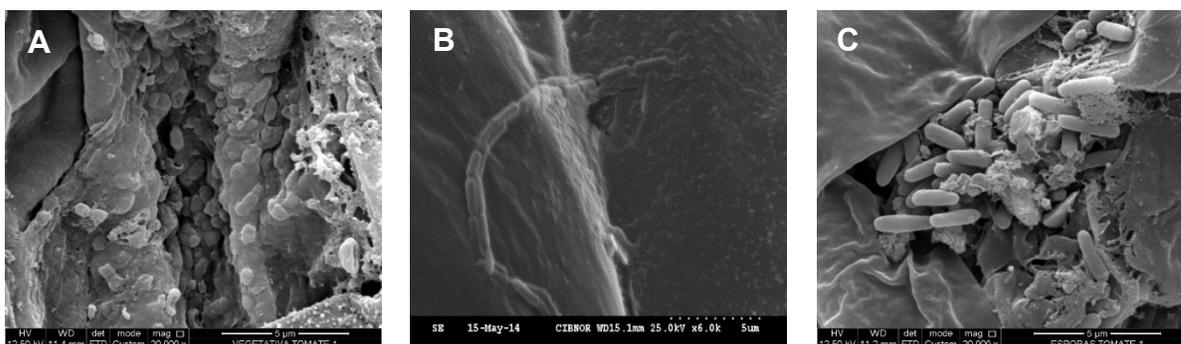
Figura 4-6. Patrones de colonización de *B.subtilis* EA-CB0575 en raíces de tomate en medio MS_(s) a los 15 DDI.

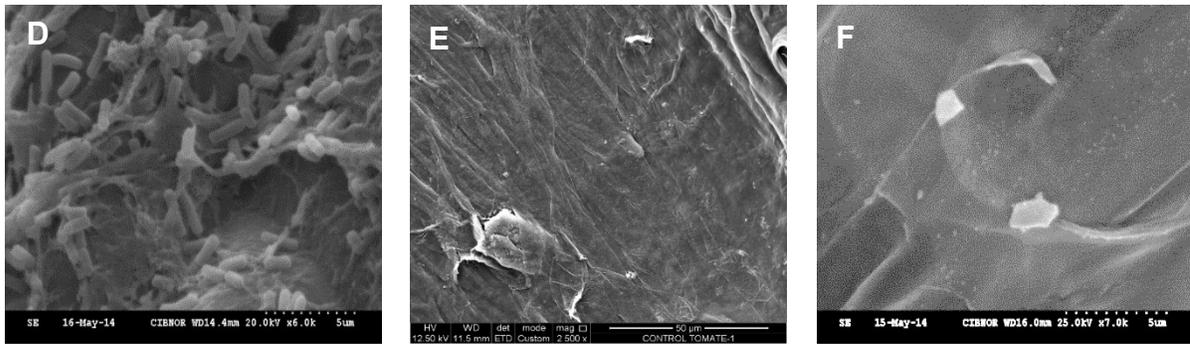


*Las flechas verdes denotan las zonas con mayor presencia de los microorganismos. Se emplearon semillas de tomate var. Chonto desinfectadas superficialmente, sembradas en medio MS_(s) con agar al 5%. Las raíces presentadas son raíces primarias en las que puede haber presencia de pelos radiculares. Se empleó la sonda /HRP/-Bs575 para la hibridación con *B.subtilis*, se realizó la amplificación de la señal empleando tiramida con emisión en el rojo (λ Absorción: 555 nm y λ emisión: 565 nm). Se empleó DAPI para tinción universal de los organismos presentes. Las imágenes presentan en fucsia las células de *B.subtilis*.

Se encontró la presencia del microorganismo en todas las secciones en las que se dividió la raíz. Sin embargo, se determinó mayor población en las secciones superior (donde es posible se presente la zona de maduración de la raíz) y en la zona inferior (donde se encuentra la zona de diferenciación celular); y una menor cantidad en la zona media (donde se encuentra la zona de elongación). Además se encontró que las células cuando están sobre la superficie de la raíz se ubican en zonas cóncavas o alrededor de la estructura radical en los pelos absorbentes, embebidas en un tipo de matriz que podría ser una biopelícula ó mucílagos de la raíz. Se determinó que no existen microorganismos epífitos en la raíz en el control debido a que los resultados con DAPI no mostraron células que hibridaran con la sonda en este tratamiento. En los tratamientos con aplicación del microorganismo se encontraron células de tamaños entre 0,7-1,5 μm sugiriendo la presencia de células vegetativas, la germinación de las esporas inoculadas en el tratamiento con esporas, y la presencia de esporas en ambos tratamientos con el microorganismo. Por medio de SEM se determinó la presencia de células similares a bacilos en las muestras con aplicación de la cepa EA-CB0575, tanto en esporas como en células vegetativas, además se observaron estructuras en forma de cadena o de aglomerados en las raíces inoculadas con estructura de biopelícula. Esto podría apoyar la hipótesis de que la cepa está germinando en la raíz y que hay colonización, debido a la formación de estructuras organizadas en zonas que podrían ser rizodepósitos. En el control no se observaron microorganismos.

Figura 4-7. Microscopía electrónica de barrido de raíces de tomate con aplicación del *B.subtilis* EA-CB0575 a los 30 DDI.





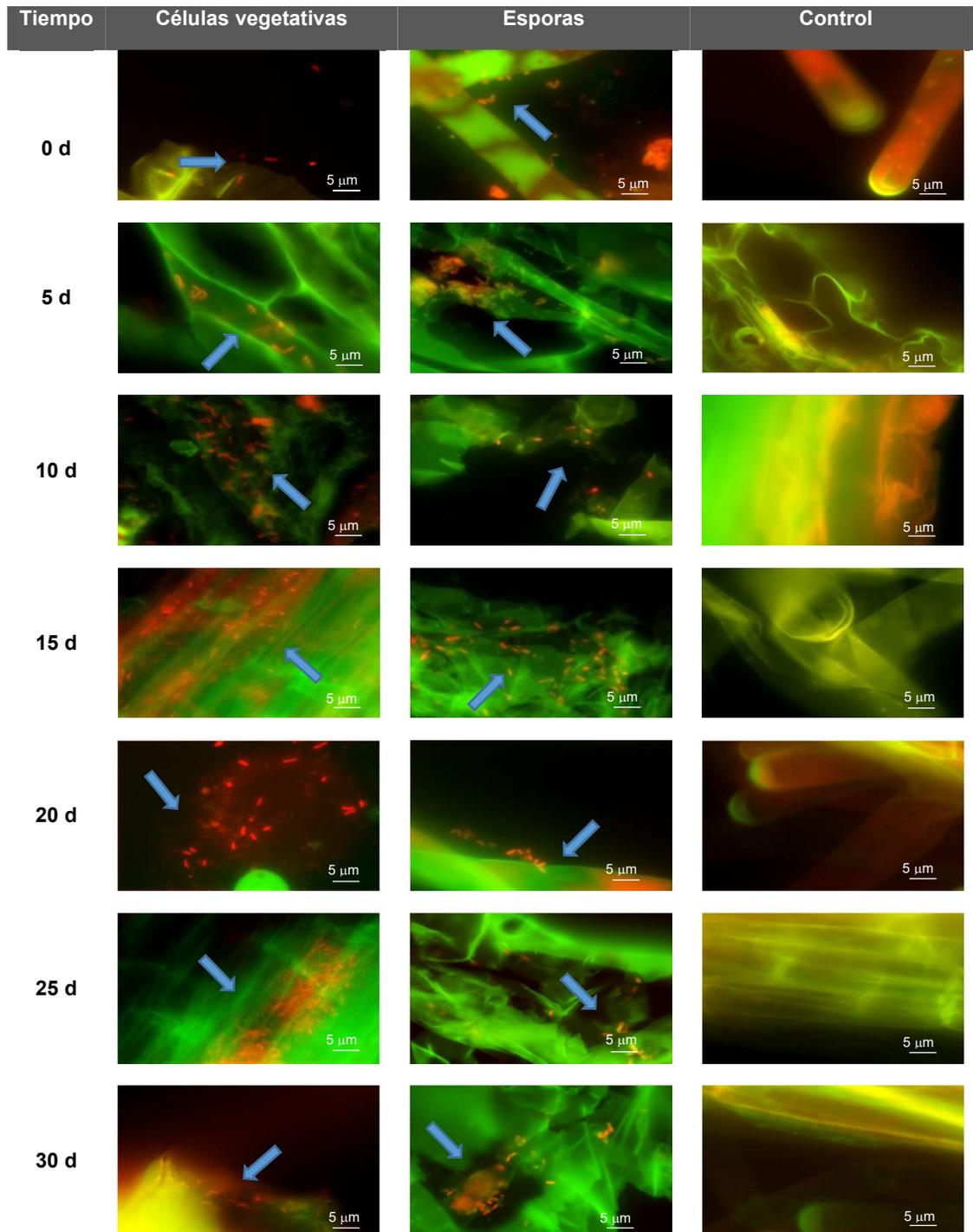
Micrografías de SEM para las raíces principales de tomate con y sin aplicación del *B.subtilis* EA-CB0575 a los 30 DDI. **A-B:** Raíces con aplicación de células vegetativas del microorganismo. **C-D:** Raíces con aplicación de esporas. **E-F:** Raíces sin aplicación (control).

4.4.3 *B.subtilis* EA-CB0575 coloniza las raíces de banano

Para determinar la capacidad de colonización de *B.subtilis* EA-CB0575 en las raíces de banano en medio MS_(s), se emplearon los métodos FISH y CARD-FISH entre 0 y 30 DDI, y SEM a los 30 DDI. Se realizó el FISH empleando la sonda Bs575-Cy3 debido a la alta fluorescencia de las raíces de banano en el rango de emisión del verde (Figura 4-8). Se observó la presencia de *B.subtilis* EA-CB0575 en las raíces principales hibridadas con la sonda Bs575-Cy3, y no se encontró evidencia de la presencia *B.subtilis* en el control. En este experimento no se hibridaron las muestras con EUBMix debido a su marcación en el mismo espectro de emisión que la sonda específica.

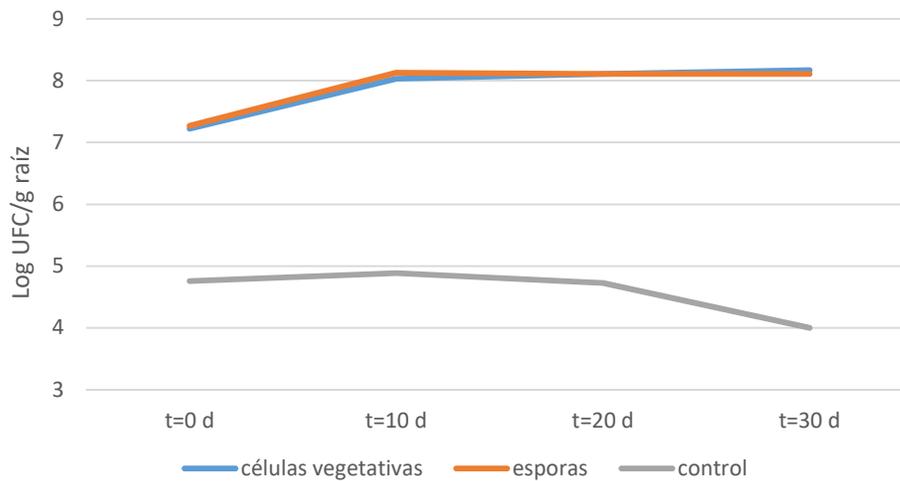
En el tiempo cero se detectaron algunas células bacterianas en los tratamientos con aplicación de la cepa de interés, pero la cantidad observada fue menor que en los tiempos 15 y 25 DDI, en los que se formaron grupos de células bacterianas alrededor de la raíz como se evidencia en las imágenes de los 10-30 DDI, para ambos tratamientos (vegetativas y esporas). Se realizó el conteo de colonias con morfologías similares a las de la cepa EA-CB0575 en cuatro tiempos (0, 10, 20 y 40 DDI), y se determinó un aumento en las colonias recuperadas entre los 0-10 DDI, posteriormente se observó una estabilización en la cantidad de colonias obtenidas (Figura 4-9). Para el control se observó que la cantidad de microorganismos recuperados y que podrían tener una morfología similar a la cepa, es muy bajo (3 órdenes de magnitud menos que los tratamientos inoculados), y parece mantenerse en el tiempo hasta los 20 DDI, aunque se encontró una reducción de estas poblaciones entre los días 20 y 30.

Figura 4-8. Detección de *B.subtilis* EA-CB0575 en raíces de banano por FISH entre 0 y 30 DDI.



*Las flechas azules denotan zonas con presencia de microorganismos. Se emplearon plantas de banano desinfectadas con hipoclorito 1,5% y etanol 70% en medio MS_(s) con agar al 5%. Las raíces presentadas son raíces primarias centrales donde pueden encontrarse pelos radiculares. Se empleó la sonda /Cy3/-Bs575 para la hibridación con *B.subtilis*. Células en rojo corresponden a *B.subtilis* que hibridaron con la sonda específica.

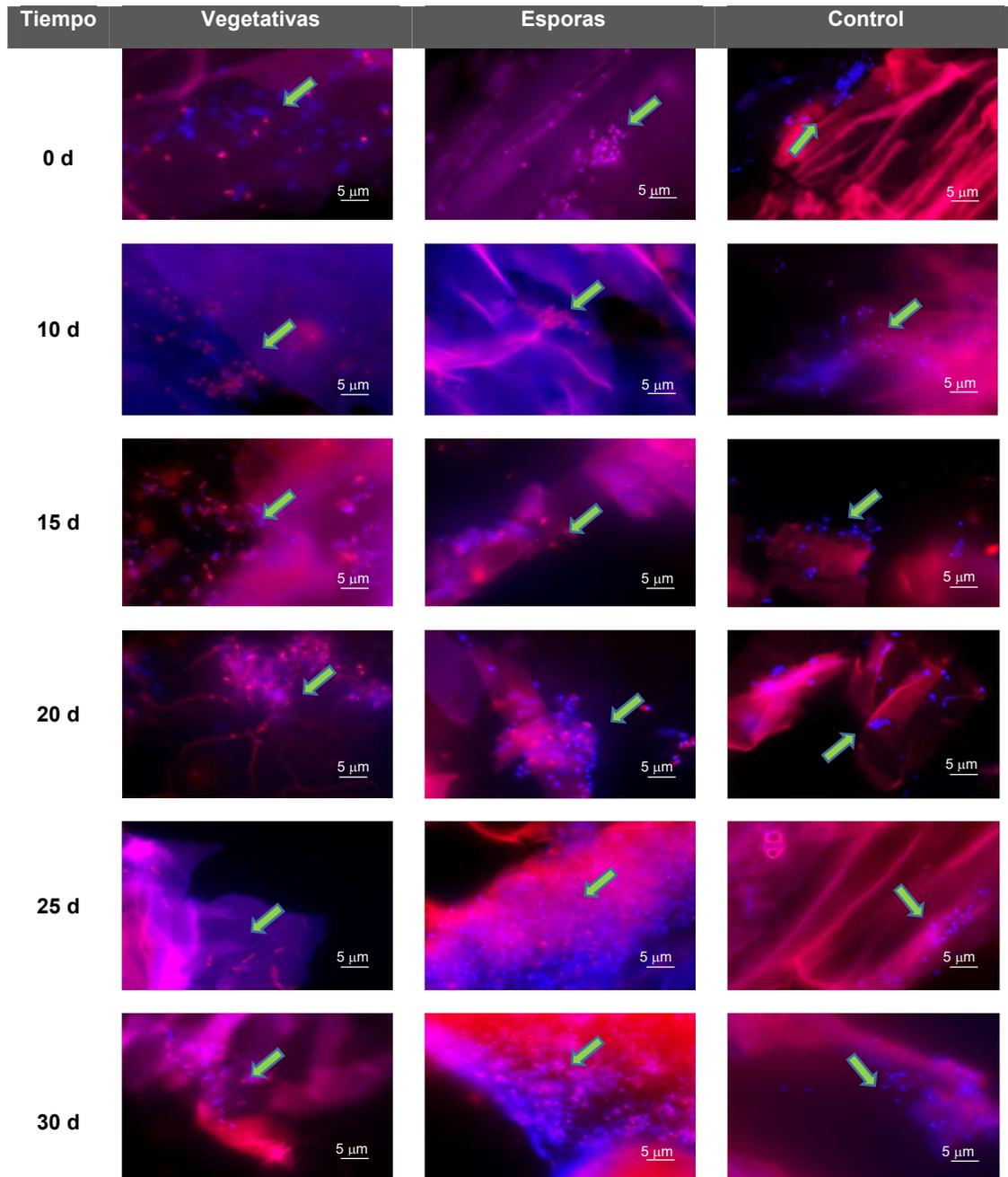
Figura 4-9. Tamaño de la población microbiana de colonias similares a *B. subtilis* EA-CB0575 presentes en las raíces de banano en medio MS(s) entre 0 y 30 DDI.



Se realizaron evaluaciones con CARD-FISH entre los 0 y 30 DDI y se encontraron microorganismos que se tiñen con DAPI pero no hibridan con la sonda, tanto en el control como en los tratamientos con *B.subtilis*. Estos organismos podrían ser bacterias nativas de la planta y no contaminación, debido a las desinfecciones realizadas a las muestras, a los correctos procedimientos realizados y a que se presentaron en los diferentes ensayos.

Se observó un aumento de la población de microorganismos que hibridaron con la sonda entre 0-20 DDI para el tratamiento con células vegetativas, posteriormente se observa una estabilización de la cantidad de organismos observados. En el tratamiento con esporas se encontró no sólo un aumento en la cantidad de células que hibridaron con la sonda sino además la presencia de células mas grandes que las esporas, tipo bacilos, las cuáles se sugiere son células vegetativas que germinaron. En el control no se observa un aparente aumento de la población de microorganismos presente. Los microorganismos que hibridan (*B.subtilis*-fucsia) no se observan aleatoriamente en la raíz sino agregadas en diferentes partes, donde podrían encontrarse rizodepósitos de nutrientes. Se observan comúnmente en las puntas de pelos radicales de la raíz primaria, o en los entrenudos existentes entre raíz primaria y secundaria. Los microorganismos que no hibridan con la sonda específica se observan en agregados por toda la raíz.

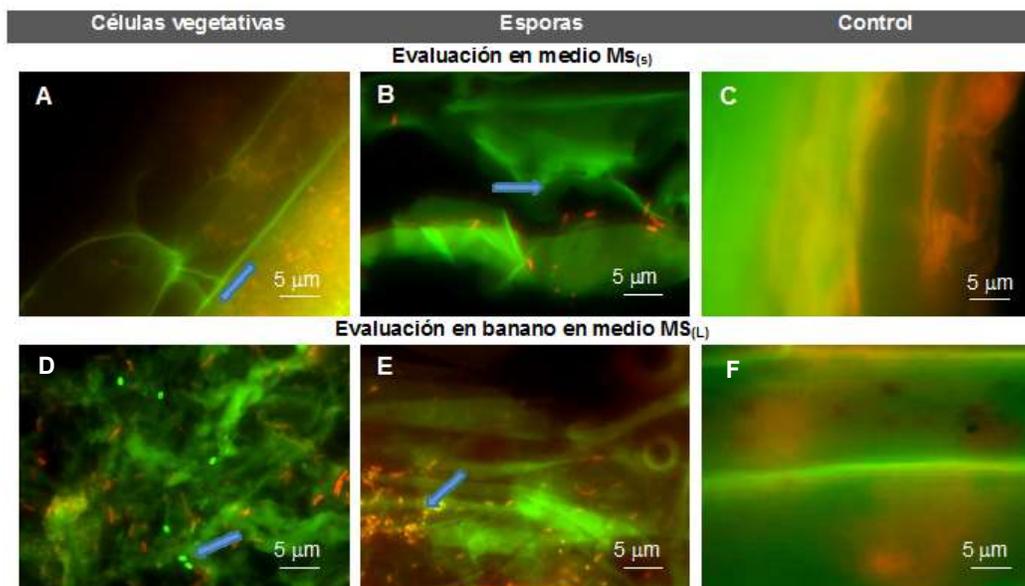
Figura 4-10. Detección de *B.subtilis* EA-CB0575 en raíces de banano por CARD-FISH (entre 0 y 30 DDI).



*Las flechas verdes denotan las zonas con mayor presencia de los microorganismos. Se emplearon plantas de banano desinfectadas con hipoclorito 1,5% y etanol 70% y sembradas en medio MS_(s) con agar al 5%. Las raíces presentadas son raíces primarias centrales y jóvenes en las que pueden encontrarse pelos radiculares. Se empleó la sonda /HRP/-Bs575 para la hibridación con *B.subtilis*, se realizó la amplificación de la señal empleando tiramida con emisión en el rojo (λ Absorción: 555 nm y λ emisión: 565 nm). Se empleó DAPI para tinción universal de los organismos presentes. Las imágenes presentan en fucsia las células de *B.subtilis*.

Se evaluó la presencia del microorganismo inoculado en las plántulas de banano los diferentes sistemas de cultivo (Figura 4-10). No se presentan evaluaciones en suelo debido a que los agregados de suelo se adhieren fuertemente a la raíz y al emplear FISH/CARD-FISH para detectar el microorganismo, evitó la obtención de resultados positivos por la alta autofluorescencia del suelo y de los materiales adheridos a la raíz. Se determinó la presencia de los microorganismos inoculados luego de 15 DDI en el sistema de cultivo MS_(L) y en MS_(s). A pesar de la diferencia en la consistencia del medio, en ambos sistemas se presentaron resultados similares. En este caso también se hibridaron las muestras con la sonda /Cy3-/Bs575, por lo cual no se determinó la presencia de otros microorganismos en las raíces que no fueran *B.subtilis*. Se realizó la evaluación de los patrones de colonización en banano a los 15 DDI empleando las raíces principales centrales más jóvenes. Para esto, las raíces se dividieron en tres secciones en proporciones aproximadamente iguales (33% de lo longitud radical). Este procedimiento se realizó para las plántulas de banano en medio MS_(s) y MS_(L).

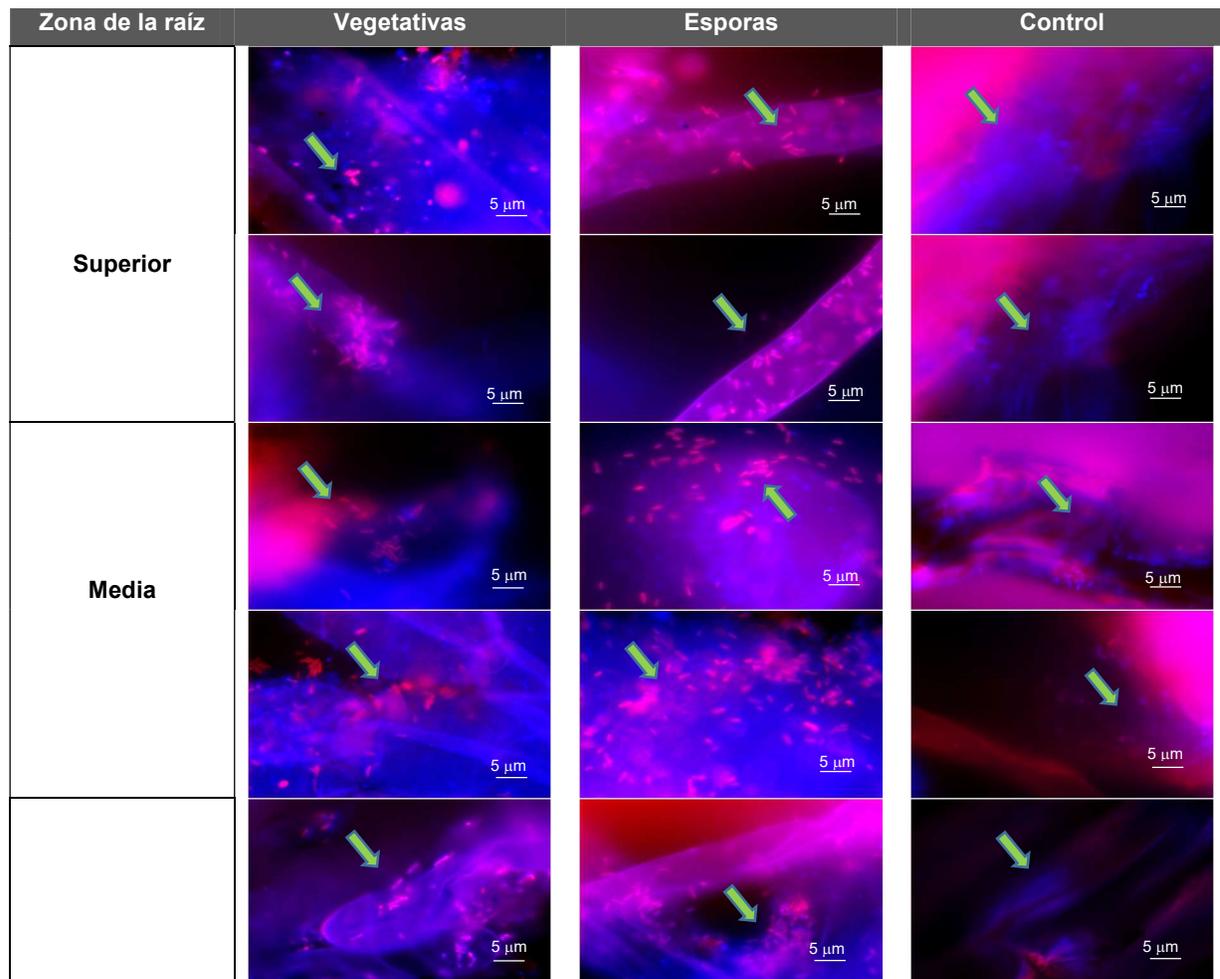
Figura 4-11. Colonización de *B.subtilis* EA-CB0575 en raíces principales de banano en diferentes sustratos de crecimiento a los 15 DDI.

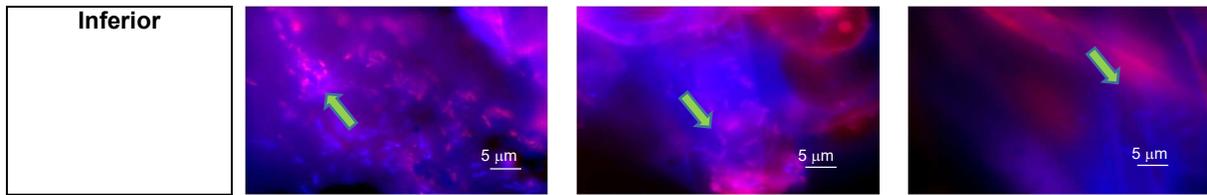


*Las flechas azules denotan zonas con presencia de microorganismos. Se emplearon plantas de banano desinfectadas con hipoclorito 1,5% y etanol 70%. Las raíces presentadas son raíces primarias centrales jóvenes. Se empleó la sonda /Cy3/Bs575 para la hibridación con *B.subtilis*. Células en rojo corresponden a *B.subtilis* que hibridaron con su sonda específica. **A, B y C.** Raíces de banano sembrado en medio MS_(s) y con aplicación de células vegetativas, esporas y sin aplicación de microorganismo, hibridadas con /Cy3/Bs575. **D, E y F.** Raíces de banano sembrado en medio MS_(L) y con aplicación de células vegetativas, esporas y sin aplicación de microorganismo, hibridadas con /Cy3/Bs575.

Los resultados de los patrones de colonización obtenidos en ambos sistemas muestran presencia de *B.subtilis* de forma indistinta en las diferentes secciones de la raíz de banano. Se presentan los resultados para medio MS_(s) (Figura 4-12). Se observa que las células se organizan en agregados y no se encuentran de forma individual en la extensión de la raíz. Se aprecian microorganismos que al parecer no corresponden a *B.subtilis* debido a que no hibridan con la sonda Bs575 (células en azul). Estos microorganismos podrían ser parte del microbioma nativo de banano, el cual puede liberarse después de la resiembra de las plántulas en el medio, donde las raíces pueden sufrir algunas lesiones y exudar sustancias como fenoles y parte de los organismos endófitos que la plántula posee.

Figura 4-12. Patrones de colonización de *B.subtilis* EA-CB0575 en las raíces de banano en medio MS_(s) a los 15 DDI.

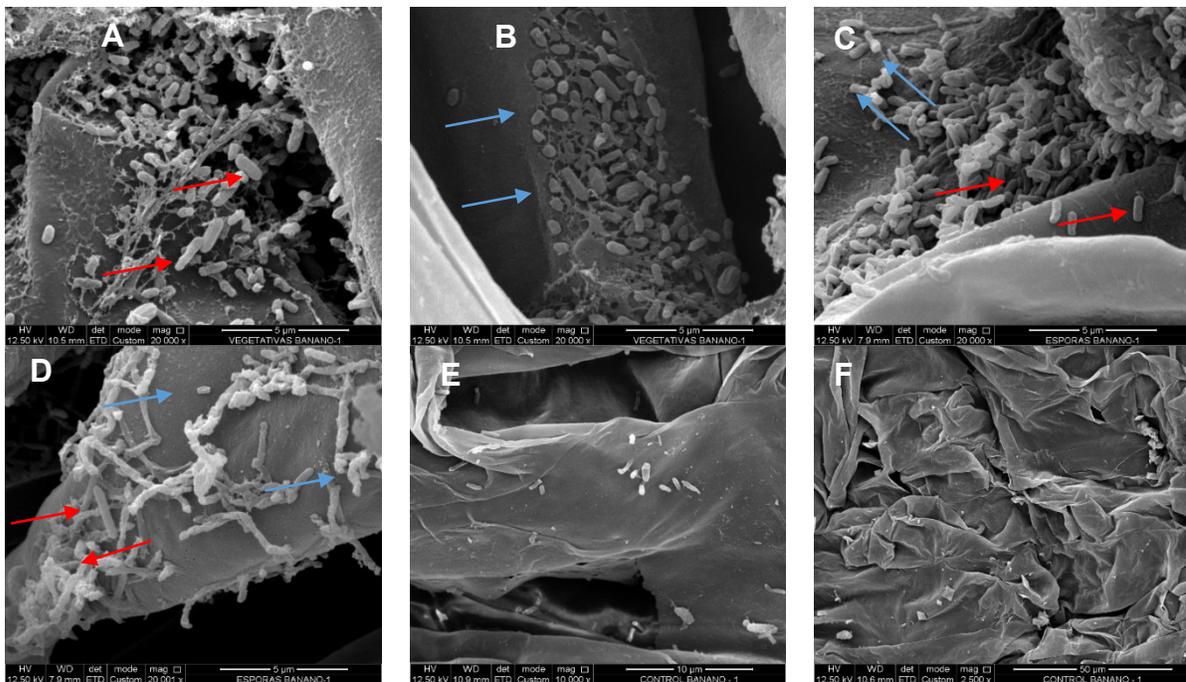




*Las flechas verdes denotan las zonas con mayor presencia de microorganismos. Se emplearon plantas de banana desinfectadas con hipoclorito 1,5% y etanol 70% sembradas en medio MS_(s) con agar al 5%. Las raíces presentadas son raíces primarias centrales y jóvenes de plantas a los 15 DDI en las que puede presentarse pelos radiculares. Se empleó la sonda /HRP/-Bs575 para la hibridación con *B. subtilis*, se realizó la amplificación de la señal empleando tiramida con emisión en el rojo (λ Absorción: 555 nm y λ emisión: 565 nm). Se empleó DAPI para tinción universal de los organismos presentes. Las imágenes presentan en fucsia las células de *B. subtilis*.

El control presenta estos microorganismos en azul y no se observan microorganismos en fucsia. Por medio de SEM se evaluó la presencia de células tipo bacilos, que sugieren la presencia de *B. subtilis*, en las raíces de las plantas con y sin aplicación. Se encontraron células con forma de bacilos en los tratamientos donde se aplicó el microorganismo (Figura 4-13).

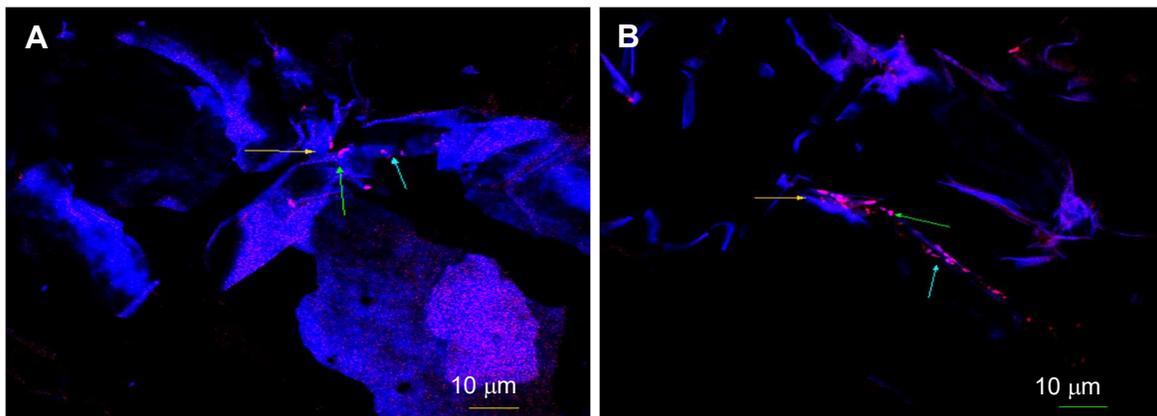
Figura 4-13 SEM de raíces de plántulas de banana con y sin aplicación de *B. subtilis* EA-CB0575 a 30 DDI.

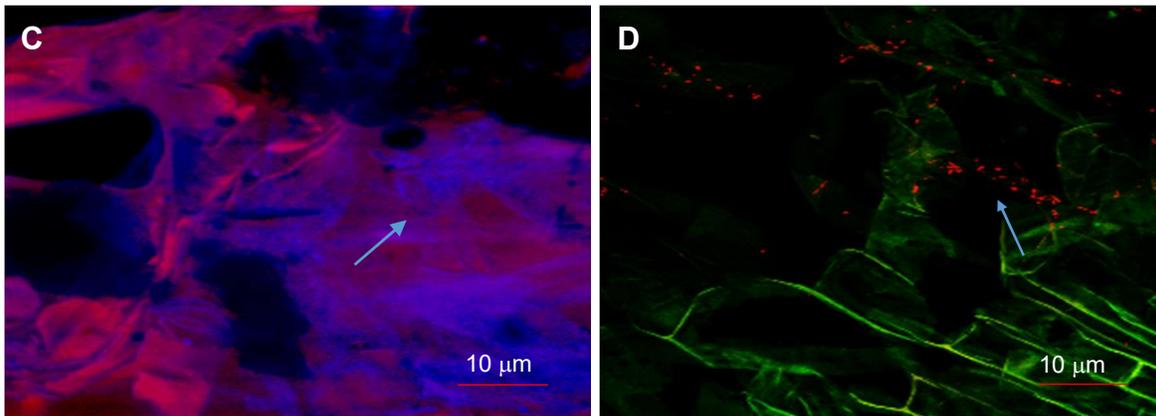


Micrografías de microscopía electrónica de barrido (SEM) para las raíces de banana con y sin aplicación de *B. subtilis* EA-CB0575 a los 30 dpi. **A-B:** Raíces con aplicación de células vegetativas del microorganismo. **C-D:** Raíces con aplicación de esporas del microorganismo. **E-F:** Raíces sin aplicación (control). Flechas azules indican células redondeadas, mas pequeñas (0,5-0,7 µm), que podrían ser esporas. Flechas rojas indican células alargadas, mas grandes, que podrían ser células vegetativas.

En los controles se encontraron también algunas estructuras similares a bacterias, con formas variadas, pero es clara la presencia de una mayor cantidad de microorganismos en aquellos donde *Bacillus* fue aplicado. En los controles se encontraron también algunas estructuras similares a bacterias, con formas variadas, pero es clara la presencia de una mayor cantidad de microorganismos en aquellos donde *Bacillus* fue aplicado. Nuevamente se observó que en los tratamientos con aplicación de esporas luego de 30 DDI hay células con forma de bacilos, lo cual puede sugerir la germinación de las esporas para generar células vegetativas. Del mismo modo que para tomate, las células forman agrupaciones, al parecer embebidas en una matriz tipo biopelícula. Se realizaron algunas micrografías en microscopio confocal láser con el fin de verificar la colonización del microorganismo aplicado en las raíces de banano, a los 30 DDI (Figura 4-14). Los resultados son congruentes con lo visualizado por microscopía de fluorescencia para los diferentes tratamientos evaluados. En el control no se observa hibridación con la sonda Bs575 pero se observan algunas estructuras que emiten fluorescencia azul, lo cual también fue encontrado previamente con el uso de CARD-FISH.

Figura 4-14. Micrografías por CLM para las raíces de banano con aplicación de *B.subtilis* EA-CB0575





Micrografías de microscopía láser confocal de las raíces de banano a los 30 DDI hibridadas por CARD-FISH con sonda Bs575-Cy3. **A-C:** Hibridación con Bs575-Cy3 y aplicación de DAPI. **A:** Raíces de banano con aplicación de esporas del microorganismo *B.subtilis* EA-CB0575 **B:** Raíces con aplicación de células vegetativas **C:** Control sin aplicación. **D:** Raíces con aplicación de células vegetativas hibridadas visualizadas con filtro FITC y Cy3.

4.5 Discusión

B.subtilis es una especie de interés para el desarrollo de bioinsumos promotores de crecimiento debido a que diferentes cepas de la especie se reportan como PGPR's (Lucy et al., 2004); sin embargo, su efecto podría verse limitado en la ejecución de algunos de los mecanismos de promoción en caso de una pobre colonización de la rizósfera (Gao et al., 2016). Los estudios de colonización de PGPR's, específicamente con *Bacillus*, son limitados; aunque en los últimos años debido a la aparición de nuevos métodos y al avance de los ya existentes, se han realizado trabajos que permiten conocer el comportamiento de las rizobacterias en la raíz, su capacidad de formación de biopelícula, establecimiento en rizodepósitos y su respuesta a moléculas secretadas por la planta o componentes de la pared celular (Beauregard et al., 2013; Dietel et al., 2013b; Yuan et al., 2015). Para detectar estos organismos, se han empleado métodos clásicos por cultivo en placa (Islam et al., 2015), métodos moleculares como el uso de sondas de hibridación o de genes reporteros (Cardinale, 2014; Fan et al., 2012b; Millet et al., 2010; Xiao-ying et al., 2015), métodos inmunológicos (Benizri et al., 1997), métodos acoplados como Nanosims (Chen et al., 2015) y métodos de nueva generación como la metagenómica (Leveau, 2007); algunos de ellos aplicables a cultivables como a no cultivables (Mendes et al., 2013; Moter & Gobel, 2000). En este trabajo se emplearon los métodos FISH, CARD-FISH y SEM con el fin de determinar la capacidad de colonización de *B.subtilis* EA-CB0575 en las raíces de banano y tomate y se diseñó una sonda que puede ser empleada en FISH ó CARD-FISH (con

variaciones en el extremo 5' según el método) buscando alta especificidad en la detección de *B. subtilis* EA-CB0575.

La sonda diseñada fue evaluada en hibridaciones con células de los géneros *Bacillus* y *Paenibacillus*, a los que pertenecen especies filogenéticamente cercanas a la cepa EA-CB0575; y de los géneros filogenéticamente distantes *Azospirillum* y *Micrococcus*. Se determinó que la sonda no es específica para la cepa de estudio, pero sí lo es para la especie *B. subtilis* (Posada et al., 2016a). Esta sonda permite diferenciar a *B. subtilis* con especies cercanas filogenéticamente como *B. amyloliquefaciens*, *B. atrophaeus*, *B. pumilus*, *B. cereus* entre otras (La cepa *B. subtilis* EA-CB0575 descrita en el capítulo 2 numeral 2.3.1, fue cultivada desde criovial en medio TSA (105458, Merck), una colonia del cultivo se llevó a medio TSB (105459, Merck) y permaneció en agitación a 150 rpm y 30°C por 24 h. Se evaluaron otros microorganismos para determinar la especificidad de las sondas en la hibridación (Tabla 4-1). Aquellos correspondientes a los géneros *Bacillus* y *Paenibacillus* se sembraron también en medio TSB, a las condiciones previamente enunciadas. *Azospirillum brasilense* Cd y *Micrococcus* M01 se sembraron en caldo nutritivo (105443, Merck) y se incubaron como los otros microorganismos por 48 h.

Tabla 4-1 El diseño de sondas específicas de especie para el género *Bacillus* es complicado, debido a la alta similaridad en el gen 16S, pocas distancias filogenéticas y dificultad para separar los clados entre las especies que lo componen (Franco Sierra & Santa-María Restrepo, 2015); además, las pocas diferencias encontradas a nivel de nucleótidos no garantizan que la hibridación no se presente debido a que la sonda puede hibridar en zonas complementarias existentes (Hugenholz et al., 2002). Existen algunas sondas diseñadas para *Bacillus* las cuales se han depositado en ProbeBase (<http://probase.csb.univie.ac.at/>). Algunas se dirigen al género *Bacillus* (Daly & Shirazi-Beechey, 2003; Demaneche et al., 2008; Felske et al., 2003; Salzman et al., 2002) y unas cuantas se han diseñado para *B. subtilis* (Kyselkova et al., 2009; Liu et al., 2001). Sin embargo, estas últimas no reportan evaluaciones de especificidad y su uso se ha limitado a sistemas de microarreglos. La sonda Bs575 se convierte entonces en una herramienta para la detección específica de *B. subtilis* por FISH/CARD-FISH no sólo en cultivo puro sino también en planta.

Una de las falencias de los métodos de hibridación empleados radica en las dificultades que se pueden presentar debido a la baja cantidad de genes objetivo en las muestras

(Zwirgmaier, 2005); Sin embargo, *Bacillus* es uno de los géneros con mayor cantidad de copias del gen 16S, por lo que este método puede ser exitoso para su detección (Větrovský & Baldrian, 2013). Otra falencia atribuida al método es la autofluorescencia de la muestra, interfiriendo con la señal fluorescente de la hibridación. Esto puede superarse con el uso de equipos como el microscopio láser confocal (CLSM), que reducen el ruido proveniente de la muestras (Cardinale, 2014), y el uso de métodos de FISH modificados como CARD-FISH, RING-FISH, DOPE-FISH, GOLD-FISH los cuales mejoran la detección de la señal (Zwirgmaier, 2005). En este trabajo se comprobó el aumento de la fluorescencia al usar CARD-FISH respecto a FISH (Eickhorst & Tippkötter, 2008; Zwirgmaier, 2005).

Los experimentos de colonización realizados permitieron determinar la presencia de *B. subtilis* en las raíces, en diferentes tiempos, para los tratamientos con aplicación de esporas y de células vegetativas de *Bacillus*. Se encontró un aumento de la población visualmente, lo que se constató por medio de la recuperación de células de las raíces por cultivo en placa. Los resultados indican colonización en la rizósfera (Beauregard et al., 2013; Budiharjo et al., 2014; Allard-Massicotte et al., 2016). Se determinó un comportamiento diferencial en patrones de colonización del microorganismo en los cultivos evaluados. En el caso de tomate, *Bacillus* se presentó predominantemente en la sección superior e inferior de la raíz, y alrededores de la TIP; encontrándose en menor cantidad en el segundo tercio de su longitud radicular. En banano se encontró una distribución similar entre las tres zonas. Reportes de Fan et al., 2012 y Chen et al., 2013 indican que los patrones de colonización de *B. amyloliquefaciens* FZB42 presentan cambios al comparar entre especies vegetales, lo que se ha confirmado en otros trabajos (Rudrappa et al., 2008a; Saile & Koehler, 2006; Vilain et al., 2006). Se determinó la presencia de estructuras similares a biopelículas sobre las raíces, lo cual ha sido ampliamente reportado por diversos autores, y es uno de los pasos requeridos para que las células se establezcan y colonicen los tejidos (Aleti et al., 2016). Esta biopelícula otorga ventajas a las células porque permite su supervivencia al ataque de predadores y ayuda a la retención de nutrientes (Dervaux et al., 2014).

En los tratamientos donde se aplicaron esporas se determinó la presencia de células vegetativas a medida que la planta se desarrollaba, tanto para tomate como banano, indicando posible germinación de estas esporas en las raíces. Esto se ha reportado para diferentes especies de *Bacillus* en *Arabidopsis* y pastos, germinando en tan sólo 24 horas después de la aplicación (Reva et al., 2004; Saile et al., 2006). La presencia de células

vegetativas en los tratamientos inoculados sugiere que las células están metabólicamente activas, pudiendo efectuar los mecanismos de promoción de crecimiento como producción de AIA, sideróforos, producción de lipopéptidos, solubilización de fosfatos o fijación de nitrógeno, potenciales que se encontraron genómica y fenotípicamente en las evaluaciones realizadas en el capítulo 2.

4.6 Conclusión

En conclusión, se diseñó una sonda para FISH/CARD-FISH específica para la detección de *B. subtilis* en diferentes ambientes. Con esta sonda se determinó que el microorganismo es capaz de colonizar las raíces de banano y tomate en diferentes sistemas de cultivo y que presenta patrones de colonización diferentes en los dos cultivos, encontrándose predominantemente en los tercios superior e inferior de la raíz y está similarmente distribuido en la raíz en el caso de banano. Se observó la presencia de agredados celulares tipo biopelícula en diferentes secciones de la raíz, lo cual corroboró por SEM y microscopía láser confocal, esta última para banano. Estos microorganismos se mantienen en las raíces aún después de 30 DDI, muchos de ellos en forma de células vegetativas, aún en tratamientos donde inicialmente se aplicaron esporas, lo cual es indicio de la germinación de las esporas en la raíz y de la posibilidad de los microorganismos metabólicamente activos para efectuar mecanismos de promoción de crecimiento vegetal en la rizósfera.

5. Evaluación de la producción de LPs en las raíces de banano inoculadas con *B. subtilis* EA-CB0575 y capacidad de formación de biopelícula del microorganismo.

5.1 Resumen

En esta parte del proyecto se evaluó la producción de lipopéptidos (LPs) en la rizósfera de plantas de banano *in vitro* con y sin aplicación de *B. subtilis* EA-CB0575. Para ello, se emplearon plantas en medio MS_(s) y MS_(l), a las que se realizaron extracciones con metanol 100%. Los extractos crudos obtenidos fueron concentrados y purificados parcialmente por extracción en fase sólida SPE C-18 y la fracción 100% metanol se evaluó por medio de espectrometría de masas de alta resolución (LC-MS/MS). Se determinó la presencia de surfactinas en las raíces de todos los tratamientos evaluados, inclusive en el control sin aplicación del microorganismo; y aunque se sabe de la capacidad de la cepa para producir fengicinas, esta familia de LPs no fue detectada en la rizósfera. Adicionalmente, se evaluó la capacidad del microorganismo para producir biopelícula *in vitro*. Se determinó que *B. subtilis* EA-CB0575 produce biopelícula en medio MS_g, y que la presencia de los extractos de raíz o de los exudados de la planta en ambiente acuoso o en medio de cultivo, hacen que la biopelícula sea más robusta. Se encontró que el microorganismo genera un crecimiento incipiente en medio MS_(l), y con la presencia de los exudados de la planta o de los extractos de raíz evaluados, este crecimiento aumenta formándose agregados.

5.2 Introducción

La especie *B. subtilis*, ampliamente distribuida en la naturaleza, está constituida por microorganismos que pueden ser empleados en promoción de crecimiento y biocontrol de cultivos. Es una especie muy versátil a nivel metabólico, lo que permite su crecimiento en diferentes ambientes (Earl et al., 2008), y dependiendo de la disponibilidad de nutrientes y las condiciones del entorno, puede formar células móviles ó estructuras multicelulares

estacionarias. En la raíz, las células individuales móviles podrían presentarse debido a que encuentran un ambiente apto para ejecutar sus mecanismos de locomoción (Kearns, 2010); y las biopelículas estacionarias, constituidas de células embebidas en una matriz extracelular compuesta de exopolisacáridos y proteína, se generan con el fin de que los microorganismos se establezcan, colonicen y formen un ambiente para su supervivencia y almacenamiento de nutrientes (Bais et al., 2004; Ghelardi et al., 2012).

Existe una relación directa entre la formación de biopelícula en diferentes ambientes y la producción de LPs, producidos por el mismo microorganismo; siendo las surfactinas los LPs de mayor estudio en este tema (Ghelardi et al., 2012; Kinsinger et al., 2003). Se ha encontrado que cepas no productoras de biopelícula como *B. subtilis* 168 y *B. subtilis* PY79 presentan mutaciones puntuales en los genes *epsC*, *degQ*, *swrA* y *sfp*, relacionados con la producción de exopolisacáridos, poli- γ glutamato, activación de movilidad por swarming y producción de fosfopanteteinil transferasa, respectivamente. Este último gen está directamente relacionado con la producción de surfactinas, y su delección genera reducción en la capacidad de colonización de *Bacillus* en diferentes ambientes; y una pobre generación de estructuras multicelulares (Branda et al., 2001; Vlamakis et al., 2013). Evaluaciones con cepas mutantes han permitido determinar que algunos de los LPs son inductores de *Quorum Sensing* (QS) en Gram positivas y su presencia conduce a la activación de genes involucrados en la síntesis de la matriz tipo biopelícula (Ongena et al., 2005; Pertot et al., 2013). La surfactina tiene la capacidad de liberar iones potasio a través de la membrana citoplasmática y esto produce la activación de la proteína-quinasa KinC, la cual activa una cadena de regulación que induce la expresión de genes implicados en la síntesis de la biopelícula, entre ellos los constituyentes del operón *epsA-O* y *tapA-sipW-tasA*, implicados en la producción de exopolisacáridos y de proteínas de matriz (López et al., 2009; Vlamakis et al., 2013). En este proceso está involucrado también el locus de genes *comQXP*, importante en el QS de Gram positivos, debido a la regulación de la producción de surfactina (Mielich-Süss & Lopez, 2015).

Los LPs son compuestos de interés microbiológico e industrial debido a su potencial de reducción en la tensión superficial, habilidad antimicrobiana, elicitación de la inducción de resistencia en la planta y a su rol importante en la colonización de microorganismos en las superficies (Raaijmakers et al., 2010). El amplio rango de actividad que tienen estos compuestos se debe a sus propiedades fisicoquímicas. Como se explicó en el capítulo 1,

estas moléculas producidas no ribosomalmente por medio de enzimas NRPS's, comprenden una cadena apolar de β -hidroxi-ácidos grasos que varía de 12 a 16 carbonos, unida a una cabeza polar formada por oligopéptidos (heptapéptidos en el caso de las surfactinas y decapéptidos en el caso de las fengicinas). Para las surfactinas, esta unión entre oligopéptidos y cadena apolar se produce por medio de un anillo lactona. En el caso de las fengicinas, el anillo lactona se presenta como estructura interna en su fracción peptídica (Nihorimbere et al., 2012). Debido a su constitución, estas moléculas pueden obtenerse como isoformas, las cuales dependen de la cantidad de carbonos en su cadena apolar ó de cambios en algunos aminoácidos presentes. Para la surfactina se han encontrado diferentes isoformas, producidas por variaciones en los aminoácidos de la segunda, cuarta o séptima posición ó cambios en la longitud de la cola apolar entre 14, 15, 16 ó 17 carbonos (Hue et al., 2001); y para las fengicinas se han determinado las isoformas A, B y C (Ongena et al., 2007; Villegas-Escobar et al., 2013). Los diferentes homólogos de estos compuestos se encuentran comúnmente en los mismos ambientes, por lo cual es posible obtener su mezcla en los procesos de extracción (Peypoux et al., 1999).

Hasta la fecha son escasos los estudios de producción de LPs *in situ* a nivel de rizósfera o filósfera y aquellos reportados emplean plantas modelo de laboratorio como *Arabidopsis thaliana*, tomate y pepino (Asaka & Shoda, 1996; Bais et al., 2004; Kinsella et al., 2009; Nihorimbere et al., 2012; Toure et al., 2004). Sin embargo, plantas de mayor complejidad a nivel radicular y con alta concentración de compuestos fenólicos, como las raíces de banano, no han sido evaluadas para tal fin. Se conoce que la presencia de fenoles en las raíces es uno de los factores claves para modular la microbiota de la rizósfera (Huang et al., 2014), lo que a su vez afecta la producción de LPs en esta zona de la planta. Adicionalmente, una mayor presencia de compuestos orgánicos en las raíces puede interferir en la detección de los LPs debido a la dificultad para su purificación. Algunos estudios han intentado dilucidar la presencia de estos compuestos en suelo y raíces, detectando surfactinas en una mayor proporción que fengicinas e iturinas (Kinsella et al., 2009; Nihorimbere et al., 2012).

Esta parte del proyecto presenta la evaluación de la producción de LPs en las raíces de las plantas de banano inoculadas con *B.subtilis* EA-CB0575 y cultivadas a nivel *in vitro* en los sistemas MS_(s) y MS_(L), con el fin de establecer relaciones entre la promoción de crecimiento que esta cepa bacteriana generó en la planta, la colonización del microorganismo en las

raíces y la producción de LPs. Adicionalmente se realizó la evaluación de la capacidad de *B. subtilis* EA-CB0575 para producir biopelícula en el medio MS_g y en el medio MS_(L), suplementados con los exudados de plantas de banano y con el extracto de las raíces; con el fin de evaluar la capacidad de producción de estas estructuras multicelulares en presencia de compuestos que se encuentran en la rizósfera o que constituyen el sistema radical de la planta.

5.3 Metodología

5.3.1 Evaluación de la producción de LPs en las raíces de banano *in vitro*

Con el fin de determinar la producción de LPs en las raíces de banano variedad Williams a nivel *in vitro* en medio MS_(s) y MS_(L), se cultivó el microorganismo *B. subtilis* EA-CB0575 en medio SBM para la producción de esporas (Posada-Urbe et al., 2015) y en medio TSB (105459, Merck) para la producción de células vegetativas, como se presentó previamente en el numeral 3.3.1 del capítulo 3. Una vez obtenidas las suspensiones bacterianas de esporas y células vegetativas del microorganismo, se procedió a su aplicación en las raíces de plántulas de banano (Meristemas de Colombia) provenientes de cultivo *in vitro* en medio MS (Murashige & Skoog, 1962) y de aproximadamente 9 meses de desarrollo desde meristemas. Estas plantas se sumergieron por 1 h en las suspensiones del microorganismo a 1×10^8 UFC/mL, se secaron en cámara de flujo laminar por 20 min y se procedió a su siembra en recipientes con 100 mL de medio MS_(s) con 5% de agar o en MS_(L) con 9 g de perlita estéril sin aplicación de agente gelificante, ambos medios a pH 5,7. Las plantas permanecieron en los sistemas de cultivo por 15 días con un régimen de luz de 12h /12h empleando lámparas Phillips Luz día de 32W. Los tratamientos evaluados fueron: plantas en medio MS_(s) con aplicación de células vegetativas, plantas con aplicación de esporas y plantas sin aplicación del microorganismo (control), además de plantas de banano en medio MS_(L) con aplicación de células vegetativas, esporas o plantas control. Se usaron 9 unidades experimentales para cada tratamiento, cada una compuesta a su vez por 9 plantas, con el fin de alcanzar la cantidad de raíces necesarias para la extracción (17 g).

Con el fin de extraer los LPs presentes en las raíces de banano sometidas a los diferentes tratamientos, se tomaron 17 g de raíces sanas, jóvenes y sin aparente fenolización, de una

muestra compuesta de raíces de cada unidad experimental; y se adicionaron a 100 mL de metanol 100%. Se llevaron a agitación a 200 rpm por 0,5 h y se filtró la suspensión con bomba de vacío empleando filtros Whatman de 125 mm. La suspensión resultante se filtró por membranas de poliacrilamida de 47 mm y de 0,22 μm y el filtrado final se evaporó en vacío (-50 psig, 50°C). El sólido obtenido se resuspendió en buffer fosfato pH 7,4 para luego aplicar 10 mL de la suspensión a una columna SPE C-18 (Bond Elud 10 g, 60 mL, Agilent Technologies, USA), siguiendo las siguientes eluciones: metanol 100% (80 mL), agua (80 mL), extracto de la raíz (10 mL), ADE (80 mL), metanol 50% (80 mL) y metanol 100% (160 mL). La fracción 100% metanol se concentró empleando el Eppendorf concentrator Plus™ (Eppendorf, Harburg, Alemania) con el fin de cuantificar la cantidad obtenida para cada tratamiento por medio de peso seco. A las fracciones 100% metanol de cada tratamiento que fueron concentradas, se les adicionó metanol 100% para ajustar su concentración hasta 1 mg/mL y se procedió al análisis por espectrometría de masas de alta resolución (LC-MS/MS).

5.3.2 Espectrometría de masas de alta resolución

Los extractos de raíz parcialmente purificados por columna SPE-C18 se analizaron por espectrometría de masas de alta resolución (Protein Facility de Iowa State University, Ames, IO, USA). Se empleó un HPLC (Agilent 1260) acoplado a un espectrómetro de masas en tándem Q-Exactive™ híbrido cuadrupole-orbitrap, de la marca Thermo Scientific, equipado con una fuente de ionización NanoSpray Flex y con ácido ciano-cinámico como matriz. Se emplearon los solventes A (agua + 0,1% de ácido fórmico) y B (acetonitrilo+ 0,1% ácido fórmico) usando un gradiente de 20-100% en 13 minutos. Los datos fueron adquiridos en un rango entre 200 y 2000 m/z en modo de ionización positiva. Se realizó un análisis de MS/MS para los iones precursores de surfactinas y fengicinas detectados (ver capítulo 2 numeral 2.4.5-producción de LPs). La lista de iones resultantes del espectro fueron generados por medio del software Xcalibur (Thermo Scientific, version 2.2). Para el análisis de los resultados se empleó el software Proteowizard 3.0.10.200 (Chambers et al., 2012).

5.3.3 Evaluación de la capacidad de formación de biopelícula de *B. subtilis* EA-CB0575 a nivel *in vitro*

Con el fin de determinar si la cepa EA-CB0575 puede formar biopelícula a nivel *in vitro*, se cultivó en 100 mL de medio TSB en Erlenmeyer de 500 mL, partiendo de dos colonias puras

del microorganismo en TSA 50%. También se cultivaron de esta manera las cepas *B. subtilis* 168 y *B. subtilis* NCTC 3610. Los cultivos se mantuvieron a 150 rpm y 30°C por 10 h con el fin de garantizar que se encontraban en fase exponencial, se centrifugaron a 4500 rpm (3260 g) por 15 min, se realizaron dos lavados de la biomasa empleando NaCl 0,85% y se ajustó la concentración de las suspensiones a 1×10^8 UFC/mL. Diez microlitros del cultivo de cada bacteria se inocularon en 10 mL de medio MSgg (Branda et al., 2001), compuesto por KH_2PO_4 5 mM (pH 7,0), 100 mM MOPS (pH 7,0), 2 mM MgCl_2 , 700 μM CaCl_2 , 50 μM MnCl_2 , 50 μM FeCl_3 , 1 μM ZnCl_2 , 2 μM tiamina; 0,5% de glicerol; 0,5% glutamato; 50 $\mu\text{g/mL}$ triptófano y 50 $\mu\text{g/mL}$ de fenilalanina, en cajas de Petri de 60*15 mm. El sistema permaneció en incubación a 30°C sin movimiento por 4 días, tiempo después del cual se determinó cualitativamente la formación de biopelícula. El mismo proceso de cultivo e inoculación del microorganismo se realizó empleando $\text{MS}_{(L)}$, para determinar la formación de biopelícula de *Bacillus* en el medio de cultivo donde se realizaron las evaluaciones de promoción de crecimiento y colonización de la rizósfera de banano y tomate.

Con objeto de evaluar si los compuestos presentes en los exudados radiculares y en los extractos de raíz de plántulas de banano pueden inducir la formación de biopelícula de la cepa EA-CB0575 en medio $\text{MS}_{(L)}$ y MSgg, se empleó una metodología basada en lo reportado por Beauregard y colaboradores (2013), con algunas modificaciones enunciadas a continuación. Los exudados radiculares de cada tratamiento (plantas con aplicación de células vegetativas, de esporas o el control sin inoculación) se obtuvieron de la fracción líquida presente en el sistema de crecimiento de banano con medio $\text{MS}_{(L)}$, tomando 30 mL de c/u de estas fracciones y posteriormente liofilizándolas en el equipo Virtis Benchtop tipo K (Virtis SP Scientific, USA). Los exudados que se colectaron junto al $\text{MS}_{(L)}$ se les denominó tratamiento exudados. Con el fin de reducir el efecto del medio $\text{MS}_{(L)}$ en las evaluaciones, se sembraron plantas de los diferentes tratamientos en el medio $\text{MS}_{(L)}$ por tres días, tiempo después del cual se transfirieron a ADE y permanecieron allí por 10 días, para luego tomar 30 mL de la suspensión, filtrarla y liofilizarla. A los exudados colectados de esta manera se les denominó exudados en H_2O .

Para obtener el extracto de las raíces de las plantas de banano, se maceraron 17 g de raíces de cada tratamiento con $\text{N}_{2(L)}$ en condiciones de esterilidad, y el extracto resultante se resuspendió en 10 mL de ADE, se filtró (filtros Sartorius, acetato de celulosa de 22 μm)

y se liofilizó. El sólido obtenido de la liofilización para cada uno de los tratamientos se resuspendió en medio MSgg o MS_(L) estéril, según el caso, y se filtró (filtros Sartorius, acetato de celulosa de 22 μm). La suspensión obtenida de los exudados (exudados en H₂O ó extracto de las raíces, cada uno en concentración de 48 mg/mL), se empleó para adicionar a microplatos de 24 pozos, en donde también se adicionó medio de cultivo y la cepa bacteriana EA-CB0575 a una concentración de 1*10⁸ UFC/mL. En cada pozo se adicionó 1 mL del medio correspondiente, MS_(L) ó MSgg, según el caso, 10 μL de la suspensión bacteriana y 20 mL de los exudados (en agua ó en medio MS_(L)) ó de la suspensión de extracto de las raíces. Se emplearon 4 pozos por tratamiento y 3 repeticiones en diferentes microplatos cada una. Los microplatos se incubaron en condiciones estacionarias y las células adheridas a las paredes se tiñeron usando cristal violeta 0,1% w/v en un buffer compuesto por (NH₄)₂SO₄ 0,15 M y 100 mM de KH₂PO₄ pH 7,0; 34 mM de NaH₂C₃H₅O(COO)₃ y 1 mM de MgSO₄*7H₂O, por 20 min (O'Toolé, 2011). El exceso de cristal violeta se removió y los pozos se lavaron con agua. El cristal violeta remanente se solubilizó empleando CH₃COOH al 30% en ADE e incubando los microplatos por 20 min. La solución resultante del lavado de los pozos se cuantificó por espectrofotometría a 550 nm, empleando CH₃COOH 30% como blanco; y se determinó la absorbancia promedio del tratamiento como variable de respuesta.

5.3.4 Análisis estadístico

Para la formación de biopelícula se empleó un análisis estadístico unifactorial para la evaluación de la absorbancia resultante de las evaluaciones con diferentes tratamientos en cada medio (MS_(L) ó MSgg) y con cada tipo de exudado ó extracto. Se evaluaron los supuestos de normalidad, homocedasticidad e independencia por medio de los test de Shapiro-Wilks, Levene y análisis gráfico de residuos vs. orden de ejecución, respectivamente. Se procedió al desarrollo del ANOVA con el cumplimiento de los supuestos, y se realizó el test LSD para el análisis de grupos homogéneos. Se empleó una confianza del 90% para los análisis en los que el método de O'Toolé fue empleado, debido a la alta variabilidad de los resultados por el método.

5.4 Resultados

5.4.1 Las surfactinas fueron detectadas en las raíces de banano *in vitro*

Por medio de evaluaciones previas se conoce que *B. subtilis* EA-CB0575 produce surfactinas y fengicinas a nivel *in vitro*, no sólo en medio MOLP (capítulo 2 numeral 2.4.5) sino también en los medios SBM y TSB (Anexo VII). Con el fin de determinar la capacidad de esta cepa para producir LPs en la raíz, donde actúa como PGPR, se realizaron extracciones de raíces de las plantas de banano inoculadas y sembradas en los medios MS_(s) y MS_(L), a los 15 DDI. Para esto, se realizó un análisis de espectrometría de masas de los extractos metanólicos de raíces con los diferentes tratamientos (control, aplicación de células vegetativas y aplicación de esporas). En todos los extractos metanólicos obtenidos se determinó la presencia de iones precursores característicos de surfactinas C13, C14, C15 y C16 (Tabla 5-1) y las intensidades de las señales precursoras fueron similares en los diferentes tratamientos. Las señales a m/z 1435,77; 1449,79; 1463,83; 1477,82; 1491,83; 1505,85 correspondientes a las iones precursores de fengicinas A y B, las cuales se conoce son producidas por el microorganismo *B. subtilis* en estudio (Capítulo 2, Figura 2-9), no fueron detectadas en ninguna de las muestras evaluadas.

En los tratamientos con aplicación de células vegetativas en ambos medios, se detectaron las señales m/z 1008,66 (surfactina C13); 1022,67 y 1044,67 (surfactina C14); 1036,67 y 1058,67 (surfactina C15), la surfactina C16 no fue detectada (m/z 1050,71 y 1072,69). En el caso del tratamiento con aplicación de esporas, todos los iones incluyendo los precursores de las surfactinas C16 fueron detectados. Para el control sin aplicación del microorganismo se encontró un comportamiento diferencial entre los medios de cultivo. Para el medio MS_(s) se detectaron las señales m/z para la surfactinas C13, C14 (m/z 1022,67) y C15. Para el medio MS_(L) todas las señales m/z de surfactinas desde C13 hasta C16 fueron detectadas. Con el fin de verificar que dichos iones corresponden a las surfactinas, se realizó su fraccionamiento por medio de LC-MS/MS encontrando las series de iones b y y descritas para surfactinas en el capítulo 2 (numeral 2.4.5 Figura 2-8).

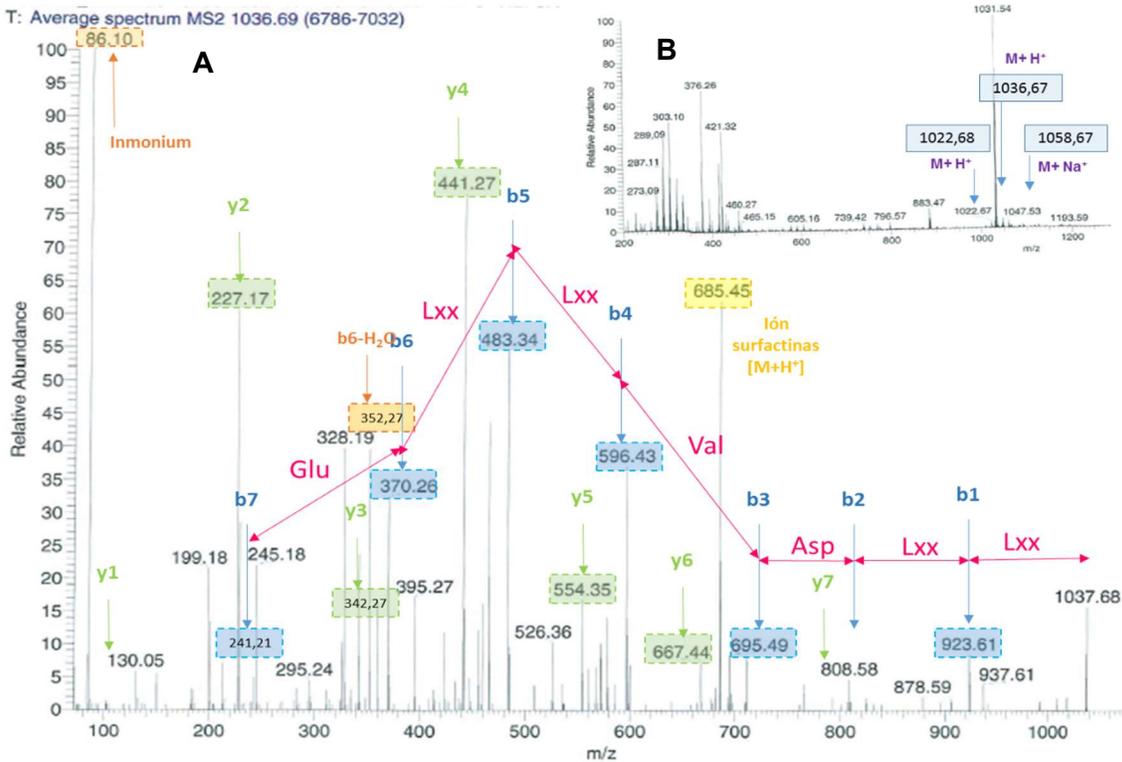
Tabla 5-1. Iones precursores detectados por medio de espectrometría de masas en tratamientos con y sin aplicación de *B. subtilis* EA-CB0575 en raíces de banano *in vitro*

Medio	Tratamiento	Iones	[M+X]	Intensidad normalizada	Metabolito	Peso molecular (Da)	
MS_(s)	Control	1008,66	M+H ⁺	1,22*10 ⁶	C13 surfactina	1007,81	
		1022,67	M+H ⁺	4,82*10 ⁶	C14 surfactina	1021,68	
		1036,69	M+H ⁺	2,88*10 ⁶	C15 surfactina	1035,87	
		1058,67	M+Na ⁺	4,51*10 ⁵			
	Células vegetativas	1008,66	M+H ⁺	3,53*10 ⁵	C13 surfactina	1007,81	
		1022,67	M+H ⁺	1,48*10 ⁶	C14 surfactina	1021,68	
		1044,67	M+Na ⁺	2,31*10 ⁶			
		1036,67	M+H ⁺	1,52*10 ⁶	C15 surfactina	1035,87	
		1058,67	M+Na ⁺	1,15*10 ⁶			
	Esporas	1008,66	M+H ⁺	1,20*10 ⁶	C13 surfactina	1007,81	
		1022,67	M+H ⁺	3,8*10 ⁶	C14 surfactina	1021,68	
		1044,67	M+Na ⁺	6,15*10 ⁵			
		1036,67	M+H ⁺	3,78*10 ⁶	C15 surfactina	1035,87	
		1058,67	M+Na ⁺	6,86*10 ⁵			
		1050,71	M+H ⁺	7,23*10 ⁵	C16 surfactina	1049,90	
		1072,69	M+Na ⁺	4,84*10 ⁵			
	MS_(L)	Control	1008,66	M+H ⁺	9,50*10 ⁶	C13 surfactina	1007,81
			1022,67	M+H ⁺	2,57*10 ⁷	C14 surfactina	1021,68
			1044,67	M+Na ⁺	2,89*10 ⁶		
			1036,69	M+H ⁺	1,47*10 ⁷	C15 surfactina	1035,87
1058,67			M+Na ⁺	1,90*10 ⁶			
1050,71			M+H ⁺	1,00*10 ⁶			

	1072,69	M+Na ⁺	5,52*10 ⁵	C16 surfactina	1049,90
	1008,66	M+H ⁺	3,53*10 ⁵	C13 surfactina	1007,81
células Vegetativas	1022,67	M+H ⁺	1,48*10 ⁶	C14 surfactina	1021,68
	1036,67	M+H ⁺	1,52*10 ⁶	C15 surfactina	1035,87
	1058,67	M+Na ⁺	1,15*10 ⁶		
	1008,66	M+H ⁺	3,44*10 ⁶	C13 surfactina	1007,81
	1022,67	M+H ⁺	8,13*10 ⁶	C14 surfactina	1021,68
1044,67	M+Na ⁺	2,88*10 ⁶			
Esporas	1036,67	M+H ⁺	4,74*10 ⁶	C15 surfactina	1035,87
	1058,67	M+Na ⁺	3,44*10 ⁶	C15 surfactina	
	1072,69	M+Na ⁺	6,39*10 ⁵	C16 surfactina	1049,90

En la Figura 5-1 se presenta el análisis MS/MS del tratamiento con aplicación de células vegetativas de *B. subtilis* EA-CB0575 en raíces de plantas de banano en medio MS_(L), para el ión precursor 1036,67. Se observan los productos iónicos “b” y “y” luego de la fragmentación. Este análisis se realizó para cada una de las muestras en medio MS_(s) y MS_(L) y se determinaron las señales m/z de los iones resultantes del fraccionamiento de la molécula (Anexo VIII). La secuencia de iones “y” encontrados fue 667,44→554,35→441,27→342,27→227,17; correspondientes a la pérdida de AG_n-E₁-Lxx₂-Lxx₃-V₄-D₅ de la región C terminal. Los iones b (azul) están representados por fragmentos iónicos a m/z 923,61→695,49→596,43→ 483,34 →370,26→241,41 interpretados como la pérdida de Lxx₇-(Lxx₆-D₅)-V₄-Lxx₃-Lxx₂-E₁ de la región N terminal. Al unir las secuencias se obtiene la estructura AG_n-E₁-Lxx₂-Lxx₃-V₄-D₅-Lxx₆-Lxx₇ correspondiente a la secuencia de C15 surfactina.

Figura 5-1. Espectros MS y MS/MS del tratamiento aplicación de células vegetativas de *subtilis* EA-CB0575 en raíces de plantas de banano en medio MS(L).

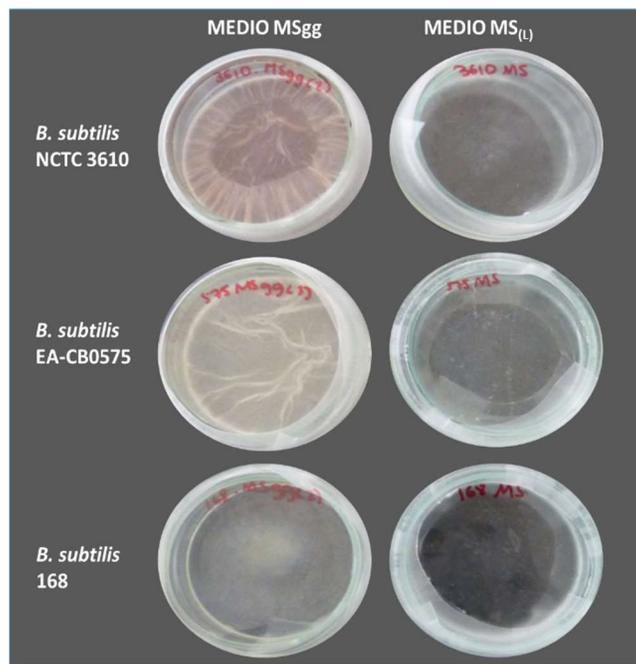


A: Espectro MS/MS para el ión precursor 1036,69 (M+ H⁺). **B:** Espectro MS obtenido para el extracto de raíces inoculadas con *B. subtilis* EA-CB0575 15 DDI.

5.4.2 *B. subtilis* EA-CB0575 tiene la capacidad de producir biopelícula en MSgg *in vitro* y la adición de polisacáridos y exudados de la planta hace mas gruesa esta matriz multicelular.

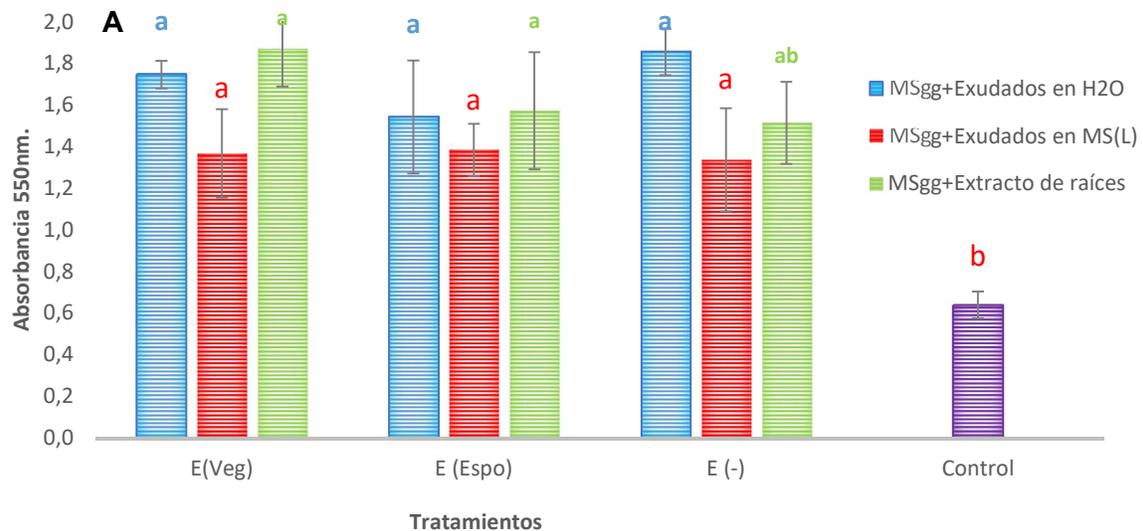
Con el fin de evaluar la producción de biopelícula de *B. subtilis* EA-CB0575 nivel *in vitro*, se realizaron cultivos estacionarios en medio MSgg y MS(L), este último sin adición de sacarosa o glucosa, como se empleó en los cultivos *in vitro* de banano y tomate. Cualitativamente se observó que *B. subtilis* EA-CB0575 produce una biopelícula comparable a la formada por la cepa referencia *B. subtilis* 3610 en medio MSgg, mientras que la cepa *B. subtilis* 168 no generó dicha estructura (Figura 5-2). Ninguna de las cepas evaluadas generó biopelícula en el medio MS(L), sin embargo, si se formaron pequeños agregados de células que se observan en el medio como masas blancas.

Figura 5-2. Producción de biopelícula de *B. subtilis* NCTC 3610, EA-CB0575 y 168 en medio MS_g y MS_(L)



Al no observarse formación de biopelícula en medio MS_(L), se evaluó si la adición de los exudados de la planta liofilizados ó el extracto de la raíz podrían promover la formación de biopelícula en el medio MS_g y MS_(L). Se encontró que en ambos medios de cultivo (MS_g y MS_(L)), los exudados radiculares de las plantas de banano obtenidos en agua o en medio de cultivo generaron un aumento de la absorbancia de las muestras, indicativo de un aumento en el crecimiento del microorganismo, respecto al control sin aplicación de exudados ó extracto de raíz (medio MS_g ó MS_(L) sólo). Se sugiere que la aplicación de las esporas ó células vegetativas no interfiere significativamente en el aumento de absorbancia de los tratamientos, debido a que la aplicación de los exudados de las plantas con estos tratamientos generó efecto estadísticamente igual sobre esta variable de respuesta (Figura 5-3). Se evidenció una biopelícula oscura en los tratamientos con extractos o exudados radiculares, pero el microorganismo sin adición de los exudados o extractos no presentó esa coloración en MS_g.

Figura 5-3. Efecto de la aplicación de exudados de la planta de banano o extractos de raíz sobre formación de biopelícula de *B. subtilis* EA-CB0575 en medio MSg



B

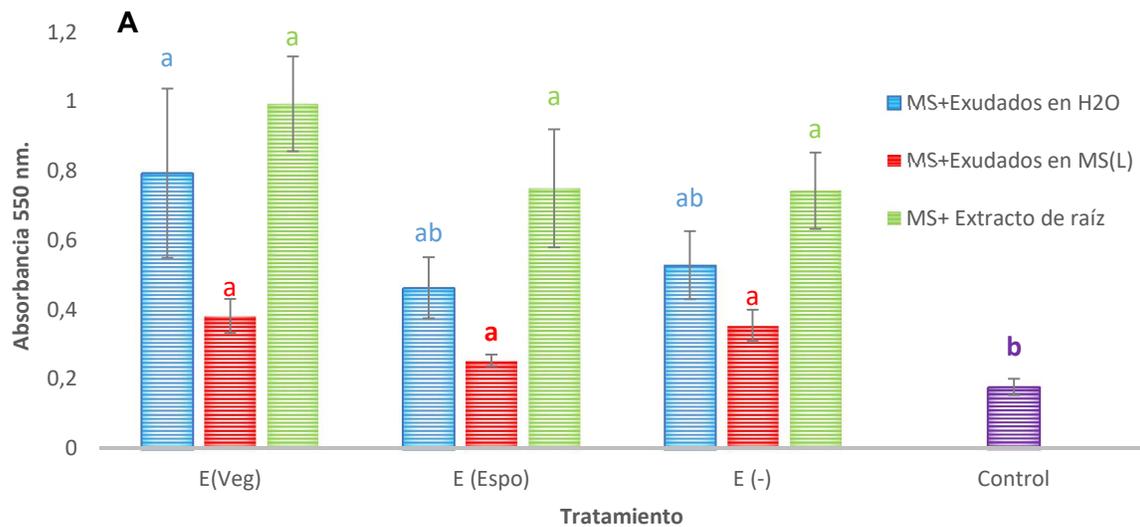


A.Gráfica de la absorbancia de cada tratamiento. Los tratamientos corresponden a **E (veg)**: medio MSgg+ adición de exudados/extractos vegetales de plantas de banano 15 DDI con adición de *B. subtilis* EA-CB0575 ($1 \cdot 10^8$ UFC/mL), en forma de células vegetativas. **E(espo)**: medio MSgg+ adición de exudados/extractos vegetales de plantas de banano 15 DDI con adición de *B. subtilis* EA-CB0575 ($1 \cdot 10^8$ UFC/mL), en forma de esporas. **E(-)**:medio MSgg+ adición de exudados/extractos vegetales de plantas de banano 15 DDI pero sin adición de *B. subtilis* EA-CB0575. **Control**: medio MSgg+ células vegetativas de *B. subtilis* EA-CB0575 ($1 \cdot 10^8$ UFC/mL). *Letras diferentes corresponden a tratamientos con diferencias significativas de acuerdo al test LSD con 90% de confianza. Valor-P=0,0432; 0,004; 0,002 para MSgg+ exudados en H₂O, MSgg+exudados en MS(L) y MSgg + extracto de raíces, respectivamente. **B.** Fotografía de una de las secciones de uno de los microplatos empleados en la evaluación, en este caso corresponde a una sección con adición de exudados de las plantas en agua.

Se realizó la misma evaluación en medio MS(L), el medio empleado para las evaluaciones de promoción de crecimiento y colonización rizosférica para la cepa EA-CB0575. Cualitativamente no se observó la formación de biopelícula en este medio, pero al evaluar los tratamientos con y sin adición de los exudados/extractos vegetales, se encontró que la

absorbancia de los tratamientos aumenta. Se observó la formación de agregados, los cuales quedaron adheridos al microplato y fue posible su tinción y posterior cuantificación, por lo tanto, a estos agregados puede atribuirse el aumento de la absorbancia, sin embargo, no conforman una biopelícula verdadera. En el tratamiento medio $MS_{(L)}$ con la suspensión de la bacteria, el crecimiento fue casi nulo igual que la formación de agregados.

Figura 5-4. Efecto de la aplicación de exudados de la planta de banano o extractos de raíz sobre formación de biopelícula de *B. subtilis* EA-CB0575 en medio $MS_{(L)}$.



B



A. Gráfica de la absorbancia de cada tratamiento. Los tratamientos corresponden a **E(veg)**: medio $MS_{(L)}$ + adición de exudados/extractos vegetales de plantas de banano 15 DDI con adición de *B. subtilis* EA-CB0575 (1×10^8 UFC/mL), en forma de células vegetativas. **E(espo)**: medio $MS_{(L)}$ + adición de exudados/extractos vegetales de plantas de banano 15 DDI con adición de *B. subtilis* EA-CB0575 (1×10^8 UFC/mL), en forma de esporas. **E(-)**: medio $MS_{(L)}$ + adición de exudados/extractos vegetales de plantas de banano 15 DDI pero sin adición de *B. subtilis* EA-CB0575. **Control**: medio $MS_{(L)}$ + células vegetativas de *B. subtilis* EA-CB0575 (1×10^8 UFC/mL). *Letras diferentes corresponden a tratamientos con diferencias significativas de acuerdo al test LSD con 90% de confianza. **B.** Fotografía de una de las secciones de uno de los microplatos empleados en la evaluación. *Letras diferentes corresponden a tratamientos con diferencias significativas de acuerdo al test LSD con 90% de confianza. Valor-P=0,0543; 0,0021; 0,0045 para $MS_{(L)}$ + exudados en H₂O, $MS_{(L)}$ +exudados en $MS_{(L)}$ y $MS_{(L)}$ + extracto de raíces, respectivamente.

5.5 Discusión

Además de mejorar la humectabilidad de las superficies, lo que se traduce en un aumento de la movilidad de los microorganismos en la rizósfera, la surfactina está involucrada en el control biológico y en la señalización para la producción de biopelícula; actividades que han sido comprobadas por medio de mutantes deficientes en la producción del LP (Chen et al., 2013; Ghelardi et al., 2012). Se ha determinado la producción de LPs en las raíces de las plantas donde las PGPR's han sido aplicadas (Nihorimbere et al., 2009), aún en las bajas concentraciones de oxígeno presentes en este ambiente, y se propone que la tasa de crecimiento de los microorganismos y el estatus de nutrición del cultivo son factores claves para la producción de estos compuestos en las raíces.

En este trabajo se detectó la producción de surfactinas en las raíces de las plantas de banano cultivadas a nivel *in vitro* en medio MS_(L) ó MS_(S), y con o sin aplicación de *B. subtilis* EA-CB0575 en la raíz. Debido a la detección del compuesto en las raíces del control sin inoculación se sugiere la presencia de otros microorganismos del género *Bacillus* en las raíces de la planta (Kinsella et al., 2009), los cuales podrían ser endófitos nativos, debido a que en el proceso de cultivo *in vitro* se realizan desinfecciones con agentes como hipoclorito y etanol, que eliminan los epífitos presentes. El hecho de encontrar LPs en el control sin la aplicación de la cepa EA-CB0575 no permite atribuir la producción de surfactinas a la presencia del microorganismo en las plantas inoculadas. En este proyecto se empleó la técnica de espectrometría de masas de alta resolución para la identificación de los LPs en la rizósfera. Sin embargo, no se realizaron procesos de cuantificación de las muestras, sólo su identificación por medio de la detección de iones precursores característicos y posterior fraccionamiento de estos iones por MS/MS. Un posible paso a seguir en la investigación en el tema debería ser la evaluación de las cantidades de LPs presentes en la raíz, con el fin de determinar si la inoculación de la cepa EA-CB0575 permite aumentar la cantidad de estos compuestos en el sistema. Para esto podría emplearse el mismo sistema de evaluación, pero en este caso usando estándares de los compuestos de interés y sus curvas de calibración, además de aplicar mejoras en el método como el uso de marcadores isotópicos ó químicos para la cuantificación (Huege et al., 2014; Frey et al., 2016).

El hallazgo de la surfactinas en las raíces y la no detección de fengicinas en las muestras, a pesar de la capacidad de producción de estos compuestos por *B. subtilis* EA-CB0575 *in vitro*, sigue la tendencia de los reportes en el tema de extracción de LPs en ambientes como

raíces y suelo, donde se ha determinado que la producción de surfactina en la rizósfera es significativamente mayor que la de fengicinas e iturinas, favoreciendo la detección de este compuesto; además, la presencia de diferentes compuestos orgánicos en el medio de detección puede generar dificultad para la purificación y detección de los compuestos de interés que se encuentran en menor concentración (Kinsella et al., 2009; Nihorimbere et al., 2009).

Se determinó la capacidad de formación de biopelícula de la bacteria *B. subtilis* EA-CB0575 en el medio MS_{gg}, un medio ampliamente empleado para esta finalidad (Dervaux et al., 2014; Vlamakis et al., 2008). Se encontró que en este medio el microorganismo forma matrices multicelulares con y sin la presencia de exudados vegetales ó extractos de raíz, pero la presencia de estas sustancias permite un engrosamiento y oscurecimiento de las biopelículas formadas. Adicionalmente, se determinó que en medio MS se presenta una formación de agregados, mas no de una biopelícula en la interfaz líquido-gas; y estos agregados aumentan con la presencia de sustancias provenientes de la planta. La no formación de biopelícula en medio MS_(L) encontrada en esta sección del proyecto, es contraria a los resultados presentados en el capítulo 4, en el que se observó por medio de FISH, CARD-FISH y SEM la presencia del microorganismo en las raíces, formando estructuras multicelulares, al parecer embebidas en una matriz que puede ser de exopolisacáridos. Es posible que los experimentos aquí presentados no reproduzcan la composición de los exudados o extractos vegetales, los cuales pueden tener una activa participación en la colonización de la cepa EA-CB0575 en la rizósfera, por lo cual se recomienda evaluar métodos alternos de extracción u otras concentraciones de metanol, que permitan extracción de compuestos de mayor hidrofobicidad, encontrados en las raíces. La concentración de estas sustancias que fue empleada en las evaluaciones podría ser diferente a las concentraciones real de estos compuestos en las raíces, por lo que se sugiere evaluar otras concentraciones de los exudados o extractos de las raíces en este medio de evaluación (MS_(L)).

Evaluaciones de producción de biopelícula similares a las aquí presentadas han determinado que la adición de exudados de la planta puede favorecer la formación de la matriz en algunos de los casos (Rudrappa et al., 2008b; Tan et al., 2013; Yuan et al., 2015), pero otras evaluaciones presentan mayor potencial en el reclutamiento de microorganismos de este género por los extractos de las raíces ó polisacáridos de la planta presentes en

ellas; que por los exudados (Beauregard et al., 2013). Se considera que estas diferencias pueden deberse a la especificidad en la quimióstasis que las PGPR's enfrentan a diferentes quimiotrayentes de las plantas, generándose cambios en el reclutamiento en la evaluación de diferentes especies vegetales. Esto puede ser la base teórica por la cual se aconseja la inoculación de cultivos con PGPR's previamente aisladas de esa especie vegetal, propiciando el contacto de la bacteria con quimiotrayentes específicos con los que ya ha estado en contacto previamente.

5.6 Conclusión

B. subtilis EA-CB0575 produce dos familias de LPs, surfactinas y fengicinas. Se realizó la aplicación del microorganismo en las raíces de plantas de banano a nivel *in vitro* y se evaluó la producción de estos LPs en las raíces de las plantas, determinando la presencia de surfactinas pero no de fengicinas. Sin embargo, se determinó también la existencia de esta familia de LP en las plantas sin aplicación del microorganismo; lo que no permite concluir que la producción del compuesto se deba a la presencia del microorganismo en la planta. Esto podría sugerir la presencia de otros microorganismos del género *Bacillus* con capacidad de producción de LPs en las raíces. Se evaluó la capacidad de formación de biopelícula por la cepa *B. subtilis* estudiada y se encontró que esta es capaz de producir biopelícula en medio MSgg y que la biopelícula aumenta su grosor con la adición de los exudados de la planta de banano ó del extractos de su raíz. Sin embargo en medio MS_(L), el cual es empleado en los cultivos de banano *in vitro*, no se observó la formación de biopelícula, aunque si se presentó la aparición de agregados celulares en los tratamientos con la adición de los extractos y exudados de la raíz. Esto podría deberse a que la concentración de los exudados o los extractos no corresponde a la que se presenta realmente en la raíz de la planta, no propiciando la quimióstasis del microorganismo, ni la activación de las rutas de señalización para producción de la matriz extracelular.

6. Efecto de *B. subtilis* EA-CB0575 sobre la microbiota cultivable asociada a plantas de banano

6.1 Resumen

En esta investigación se evaluó la microbiota nativa presente en plantas de banano *in vitro* en medio MS_(s) por métodos cultivables, determinando una alta proporción (46,4-92,4%) de microorganismos del género *Bacillus* entre los endófitos aislados. Cerca de un 83% de *Bacillus* fueron identificados como *B. subtilis*; sin embargo, sólo 19 de las 31 cepas presentaron hibridación por FISH con la sonda BS575, diseñada en este mismo trabajo. Se determinó que la microbiota nativa del cultivo está conformada adicionalmente por los géneros *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Methylobacter*, *Microbacterium*, *Staphylococcus*, *Micococcus*, *Rhodopseudomonas*, entre otros, aunque en menor proporción que *Bacillus*. La diversidad α encontrada para los lotes de banano *in vitro* evaluados fue variable debido a las diferencias intrínsecas entre los cuatro lotes. Sin embargo, la poca riqueza de especies y la dominancia de *Bacillus* hacen que la diversidad β presente comunidades similares a nivel global. Empleando métodos cultivables, se determinó que la aplicación del microorganismo *B. subtilis* afecta la diversidad de las plantas inoculadas al compararla con la diversidad de plantas sin inocular, reduciéndose la riqueza y abundancia de otras especies diferentes a *Bacillus*, en las muestras.

6.2 Introducción

Las plantas son organismos hospederos de una diversa y abundante microbiota bacteriana, conformada principalmente por Actinobacterias, Bacteroidetes, Firmicutes y Proteobacterias, los cuales pueden tener efectos importantes en la salud y desarrollo del sistema vegetal (Bulgarelli et al., 2013). Esta microbiota puede ser adquirida del ambiente, o por transferencia vertical desde la progenie. Las semillas por ejemplo, presentan microorganismos que van colonizando la planta y desarrollándose en la medida que la planta germina y crece. En el caso de los cultivos *in vitro* a partir de meristemos, como el

banano, esta microbiota además de provenir del ambiente puede generarse a partir de los rizomas empleados en el proceso de producción por transferencia parental de microorganismos (Msogoya et al., 2012), de forma similar a la transferencia que la madre realiza a sus hijos en el reino animal (Ramírez-Puebla et al., 2013). Debido a lo anterior, a las plantas se les considera holobiontes (Guerrero et al., 2013), concepto presentado desde los años 90's por Margulis con el fin de indicar que gran cantidad de simbiontes, principalmente microorganismos, co-existen con hospederos y hacen parte de su historia evolutiva (Rosenberg & Zilber-Rosenber, 2016).

La microbiota vegetal puede ser del tipo epífita, aquellos microorganismos ubicados en la superficie de la planta (Lindow & Brandl, 2003), o endófito, aquellos que se encuentran internamente en los órganos y tejidos (Hallmann et al., 1997). Esta clasificación según su ubicación permite que se consideren endófitos a los organismos inócuos como también algunos que podrían ser patógenos para el sistema vegetal; sin embargo, en los últimos años el término de endófito se ha restringido a la microbiota que emplea su ciclo de vida invadiendo los tejidos, y que tienen una estrecha relación con la planta, sin generar un efecto negativo a su hospedante; por el contrario, se considera que podría ser de interés en evaluaciones de promoción de crecimiento vegetal o biocontrol (Baldan et al., 2015; Compant et al., 2010). A pesar de que muchos de los microorganismos que pueden presentarse en los tejidos tengan potencial benéfico, cuando se trata de cultivos *in vitro*, la presencia de bacterias es declarada indeseada y se procede al uso de agentes desinfectantes y antibióticos, buscando erradicar la totalidad de microorganismos presentes (Orlikowska et al., 2017). Por esta razón, es poco el conocimiento que se tiene de los endófitos que se presentan en estos cultivos y no se conoce el rol que estos representan en su evolución y adaptación ambiental (Liaqat & Eltem, 2016).

En el caso del banano, *Musa AAA*, el sistema de propagación *in vitro* es muy eficiente, generando plántulas de alta calidad, uniformes y libres de enfermedades o plagas. Este sistema de cultivo empleado para las variedades comerciales, ha sido de gran importancia para la propagación de esta planta monocotiledónea a nivel mundial, debido a que a diferencia de sus parientes nativos, estas variedades no presentan reproducción por semilla, polinización o fertilización; sino propagación vegetativa. Este cambio, generado por largos procesos de domesticación y una serie de mutaciones que generaron frutos partenocárpicos, ha llevado a los productores a depender de la propagación por rizomas en

medios de cultivos sintéticos y en condiciones de alta asepsia, o a iniciar sus cultivos a partir de cormos (comúnmente denominados “cabeza de toro” por los agricultores); siendo esta última una alternativa que resulta económica, pero que puede ser un foco de transmisión y propagación de enfermedades (Heslop-Harrison & Schwarzacher, 2007). El cultivo de tejidos, en cambio, genera plantas libres de patógenos, pero su proceso de adaptación de las plantas en invernadero y campo resulta complejo debido a la gran cantidad de factores bióticos y abióticos a los que ellas deben enfrentarse (Chandra et al., 2010).

El uso de bacterias promotoras de crecimiento es una alternativa para mejorar la sanidad y productividad de los cultivos, y su aplicación desde etapas tempranas de desarrollo es una opción para mejorar la adaptabilidad de la planta y protegerla en el momento de paso a invernadero y campo (Vestberg & Cassells, 2009). Sin embargo, la aplicación de estos microorganismos podría afectar a las comunidades nativas presentes en la planta generando alteraciones a nivel de ecología microbiana (Berg & Zachow, 2011), pero las investigaciones en el tema no son concluyentes. Algunos reportes indican un efecto sobre la diversidad y abundancia de los microorganismos nativos, otras declaran que el efecto es neutro y otros reportes indican que el efecto puede ser benéfico (Trabelsi & Mhamdi, 2013). Se considera que las diferencias en los resultados en investigaciones del efecto de esta inoculación sobre la microbiota de la planta depende de las interacciones presentes, de los grupos bacterianos afectados, de las especies predominantes, de los métodos empleados para medir este efecto, entre otros (Castro-Sowinski et al., 2007; Trabelsi & Mhamdi, 2013).

Se ha determinado que la aplicación de las PGPR's podría inducir perturbaciones en el equilibrio de las comunidades microbianas del suelo, los cuales serían indeseados si se pierden especies nativas importantes para la planta (Trabelsi et al., 2013; Schmidt et al., 2014). Además, la presencia de estos microorganismos en altas concentraciones puede generar una alta actividad antibiótica en las zonas de inoculación, reduciendo las poblaciones de otros microorganismos presentes (Figueroa-López et al., 2016). Aunque esto podría ser cierto, también se ha establecido que esta actividad puede ser transitoria y tener un efecto temporal y espacial limitado. Además otros factores como la versatilidad nutricional y la separación espacial tiene también influencia directa en esta interacción, permitiendo o no que el efecto se presente, y de presentarse, la resiliencia del ecosistema podría amortiguar el efecto de estos microorganismos (Kennedy, 1999). Otros estudios

plantean que la pérdida de ciertas especies bacterianas, podría no cambiar el funcionamiento del sistema debido a la redundancia, siempre y cuando diferentes especies bacterianas realicen la misma función (Trabelsi & Mhamdi, 2013).

Contrario a los trabajos que exponen un efecto negativo de las PGPR's sobre la microbiota, existen investigaciones que indican un efecto positivo de la inoculación, planteando que la presencia de las PGPR's provoca una alta actividad metabólica y enzimática en la rizósfera, lo que podría reflejarse en un sistema radicular mas desarrollado y un suelo mas activo (Castro-Sowinski et al., 2007). Se hace entonces importante realizar estudios de cómo las PGPR's afectan los sistemas donde se aplican y determinar la temporalidad de estos efectos en la rizósfera. Por este motivo, en esta parte del proyecto busca determinar los componentes de la microbiota nativa de la planta de banano y el efecto de la aplicación de *B. subtilis* EA-CB0575 sobre la composición de esa microbiota para banano variedad Williams a los 7 DDI, con miras a entender si el inoculante podría generar alteraciones en la ecología de los microorganismos nativos endófitos de la planta de *Musa* AAA, a nivel *in vitro*.

6.3 Metodología

6.3.1 Aislamiento de microorganismos endófitos

Con el fin de aislar los microorganismos endófitos presentes en las raíces de plantas de banano variedad Williams con aproximadamente 9 meses de desarrollo *in vitro* y sembradas en medio MS_(s) a 30°C y fotoperíodo 12 h/12h, se emplearon 5 g de raíces, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1,5% por 15 min, 3 lavados con ADE, etanol 70% por 20 min y tres lavados finales con ADE. Las raíces desinfectadas se llevaron a 45 mL de buffer fosfato pH 7,4 en un Ultraturrax IKA 20 W para macerar las raíces por 10 min a 2000 rpm. A la suspensión resultante se le realizaron diluciones seriadas entre 10⁰ hasta 10⁻³ y se sembraron por superficie 100 µL de cada una de las diluciones en los medios TSA x 0,5 (9 g/L de bactoagar BD y 20 g/L de TSA 105458, Merck), el cual es un medio enriquecido y de amplio espectro (Atlas, 2010); AIA (0,1 g/L de L- Asparagina; 0,5 g/L de K₂HPO₄; 0,001 g/L de FeSO₄*7H₂O; 2 g/L de caseinato de sodio; 0,1 g/L de MgSO₄*7H₂O y 15 g/L de Agar), empleado para aislamiento de actinomicetes (Chaudhary et al., 2013); YDC (20 g/L de CaCO₃, 20 g/L de glucosa, 10 g/L de extracto de levadura y 15 g/L de bactoagar a pH 7,0),

(Atlas, 2010) y PIA (1,4 g/L de $MgCl_2$; 20 g/L de proteosa peptona; 10 g/L de sulfato de potasio; 0,025 g/L de triclosán y 13,6 g/L de bactoagar (281210, Difco) a pH 7,0), para aislamiento de *Pseudomonas* (Keeven y de Cicco, 1989). Las cajas Petri se incubaron por 5 días a 30°C y posteriormente se determinó el tamaño de la población microbiana mediante al conteo de unidades formadoras de colonia (UFC) en aquellas cajas donde hubiera entre 30 y 300 colonias por caja. De dichas cajas se determinó la morfología de las colonias y su abundancia, y se conservó una colonia por morfotipo/réplica. Este proceso se realizó para 4 lotes de plantas en tiempos diferentes (Febrero, Marzo, Abril y Junio de 2016), para cada lote se realizaron tres réplicas y se emplearon 4 cajas de Petri por dilución. Una porción de las raíces desinfectadas se empleó para determinar su adecuada desinfección por medio de una impronta en medio TSA x 0,5; además la solución final de lavado del proceso de desinfección se sembró para este mismo fin. Los microorganismos fueron aislados, purificados y conservados en el medio líquido correspondiente a su aislamiento y con 20% de glicerol, a -80°C. Las cepas conservadas se almacenaron en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad EAFIT, Medellín, bajo el permiso marco de recolección Resolución 1566 del 2014, con el número de colección RCN226.

6.3.2. Extracción de DNA e identificación de aislados

Con el fin de extraer el DNA de los microorganismos obtenidos se procedió al cultivo de estos en medio TSB por 24 h y posterior extracción de DNA de cada cultivo, empleando el Kit de extracción Ultraclean Microbial DNA isolation (Mobio, 12224), según procedimientos establecidos por el proveedor. Se evaluó la integridad del DNA por electroforesis en gel de agarosa al 1,0 % y se procedió a la amplificación del gen 16S rDNA usando los primers 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) y 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Weisburg et al., 1991). Para la PCR se emplearon 0,02 U/ μ L de Taq Polimerasa Thermo Scientific 5 U/mL EP0402; 0,2 μ M de cada primer; 0,2 mM de un mix de dNTP's; 1,5 mM de $MgCl_2$; 1X del buffer de la Taq y 1 μ L de DNA. El volumen de la reacción se ajustó a 50 μ L empleando agua ultrapura libre de DNAsas (Amresco, E479). Se empleó una temperatura de alineamiento de 60°C (20 s), una desnaturalización inicial a 94°C (3 min), 30 ciclos de amplificación con desnaturalización a 94°C (30 s), alineamiento 20 s y extensión a 72°C (90 s), seguida por una extensión final a 72°C (5 min). Los productos de la PCR fueron evaluados por medición en NanoDrop 2000 (Thermo Scientific™) y por prueba de integridad en gel de agarosa al 1,0 %. Las muestras fueron secuenciadas por método Sanger para

amplificación del gen 16S rRNA (1484 pb), empleando la pareja de primers 8F y 907R (5'-CCGTC AATTCMTTTRAGTTT-3'). Las secuencias fueron procesadas con los software BioEdit v.7.2.5 y Mega 6.0 para construir la secuencia consenso, que posteriormente se analizó en el BLAST (NCBI, Genbank) y en la plataforma SILVA (Yilmaz et al., 2013) y se seleccionaron las especies de mayor porcentaje de identidad. Como actividad complementaria a la identificación, a los aislados identificados como *B. subtilis*, se les realizaron hibridaciones por medio de FISH, para ello se prepararon cultivos de cada uno de los aislados, se dejaron en incubación en TSB 24 h, a 30°C y 150 rpm, y se empleó el protocolo presentado en el capítulo 4 (numerales 4.3.4 y 4.3.6) para la hibridación. Se usó la sonda /56-FAM/Bs575 diseñada en este proyecto, junto con la mezcla de sondas universales EUBMIX. La hibridación fluorescente en el filtro FITC indicó resultados positivos para la hibridación.

6.3.3 Análisis de diversidad de la microbiota de banano

Partiendo del tamaño de la población de cada aislado (UFC) y su identificación taxonómica, se realizaron matrices de presencia/ausencia y de abundancia de taxa (a nivel de género) para cada lote y medios evaluados. Por medio de estas matrices se calcularon los índices de α -diversidad (Riqueza, Shannon-Weiner, Simpson y Berger-Parker) y β -diversidad (Índice de Whittaker). Para evaluar diferencias entre estas medidas se empleó la prueba de comparación de diversidad mediante permutación del Software PAST3X (PAleontological STatistics) versión 3.14. y se complementó con un test de diversidad t. Se determinaron también el análisis de rarefacción basado en individuos con un 95% de confianza, los análisis PCoA basados en distancia Bray-Curtis, para los lotes y los géneros bacterianos aislados, y se emplearon los análisis de perfiles de diversidad derivados de los índices de Renyi's (Tóthmérész, 1995).

6.3.4 Efecto de la aplicación de *B. subtilis* EA-CB0575 sobre la microbiota nativa de banano variedad Williams a nivel *in vitro*

Con el fin de determinar el efecto que genera la aplicación del microorganismo PGPR en la microbiota nativa de *Musa* AAA variedad Williams se desinfectaron y sembraron plántulas de banano con y sin aplicación de *B. subtilis* EA-CB575 en forma de esporas ó células vegetativas en medio MS_(s) (Murashige & Skoog, 1962) empleando la mezcla de sales MS (M524 Phytotech Laboratories) y 5 g/L de bactoagar (064010023, BD Becton Dickinson) a

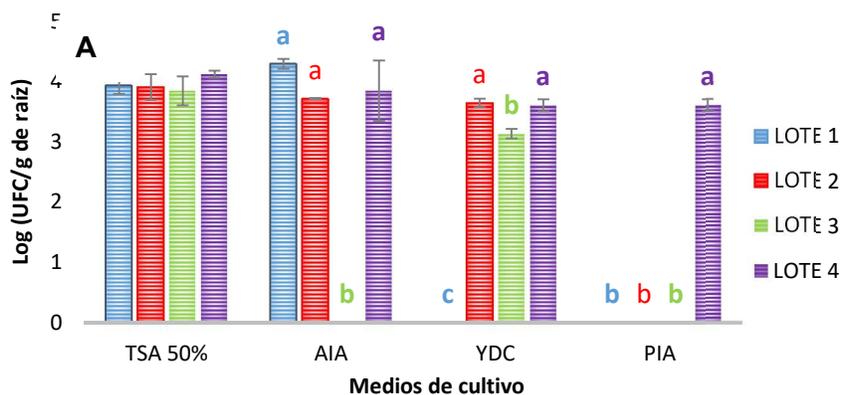
pH de 5,7. La cepa EA-CB0575 se cultivó en medio TSB por 24 h para la producción de células vegetativas y en medio SBM (Posada-Uribe et al., 2015) por 72 h para producción de esporas. Los cultivos se centrifugaron a 4500 rpm (3250 g), se realizaron dos lavados de la biomasa con NaCl 0,85% y se resuspendieron en ADE a una concentración de $1 \cdot 10^8$ UFC/mL. La suspensión de esporas se sometió a choque térmico a 80°C por 20 min. Las plantas se desinfectaron como se enunció previamente y se sumergieron por 1 hora en la suspensión bacteriana correspondiente (esporas ó vegetativas) ó en ADE, para el caso del control sin inoculación, se secaron en cámara de flujo por 20 min y posteriormente se sembraron en 50 mL de medio MS_(s) al 5% de agar. Luego de 7 días de desarrollo, las plantas con y sin aplicación de *Bacillus* se emplearon para proceder a la extracción de la microbiota de la raíz como se presentó en el numeral 6.3.1 y a la extracción de DNA de cada cepa, como se indicó en el numeral 6.3.2. En este caso sólo se empleó el medio TSA x 0,5 para el aislamiento de los microorganismos. Las colonias obtenidas se cuantificaron, se caracterizaron morfológicamente y se conservaron en TSB con 20% de glicerol a -80°C. Se realizaron los análisis de diversidad previamente enunciados y sus resultados se compararon posteriormente por test t y de permutación con el fin de conocer si la aplicación del microorganismo genera diferencias significativas en las poblaciones microbianas.

6.4 Resultados

6.4.1 El género *Bacillus* es el principal componente de la microbiota nativa de banano *Musa AAA* variedad Williams, *in vitro*

Con el fin de determinar el tamaño de la población microbiana presente en las plantas de banano 7 días después de la siembra a nivel *in vitro*, se cuantificaron las colonias obtenidas en los medios TSA x 0,5; AIA; PIA y YDC. El tamaño de la población microbiana endófito total obtenida en medio TSA en los 4 lotes evaluados fue similar e igual a $9,31 \cdot 10^3 \pm 0,48 \cdot 10^3$ UFC/g; mientras que en los medios AIA, YDC y PIA el tamaño de la población fue dependiente del lote evaluado, encontrándose que en al menos en un lote no se presentó crecimiento de microorganismos provenientes de las raíces de la planta. Se evaluó el total de microorganismos aislados de las plantas en los diferentes lotes, se determinó que esta cantidad no presenta diferencias significativas entre lotes (datos no mostrados).

Figura 6-1. Tamaño de la población microbiana endófitas de las raíces de plantas de banano variedad Williams a nivel *in vitro*.



Se realizó comparación entre lotes en los diferentes medios. Letras diferentes corresponden a tratamientos con diferencias significativas de acuerdo al test LSD con una confianza del 95%. TSA Valor-P=0,806; AIA Valor-P=0,0001; YDC Valor-P YDC=0,000; PIA Valor-P=0,000.

Los diferentes aislados microbianos fueron identificados empleando el gen 16S rRNA y las secuencias consenso obtenidas se analizaron en las bases de datos BLASTn y SILVA, adicionalmente se determinó su morfología (Tabla 6-1).

Tabla 6-1. Aislados endófitos de los diferentes lotes de banano variedad Williams y sus identidades de acuerdo a la secuenciación del gen 16S rRNA.

Medio	Morfotipo	Código	Taxonomía	Homología (%)	Referencia	FISH con /56-FAM/-Bs575
TSA	1	EA-ED0479	<i>Bacillus subtilis</i>	100	KU922443.1	Positivo
	2	EA-ED0480	<i>Bacillus subtilis</i>	100	KC813165.1	Positivo
	2	EA-ED0481	<i>Bacillus subtilis</i>	98	KX426646.1	Positivo
	3	EA-ED0482	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	100	KT959339.1	n/d
	2	EA-ED0483	<i>Bacillus subtilis</i>	100	JX051359.1	Positivo
	1	EA-ED0484	<i>Bacillus subtilis</i>	99	KU862326.1	Positivo
	2	EA-ED0485	<i>Bacillus subtilis</i>	99	KX426660.1	Positivo
	1	EA-ED0506	<i>Bacillus altitudinis</i>	99	KC171989.1	Negativo

	8	EA-ED0507	<i>Rhodopseudomonas</i> sp.	95	KJ460004.1	n/d
	9	EA-ED0508	<i>Bacillus subtilis</i>	99	KJ438701.1	Negativo
	9	EA-ED0509	<i>Bacillus subtilis</i>	100	KX420706.1	Negativo
	2	EA-ED0510	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99	CP017676.1	Negativo
	10	EA-ED0511	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	KJ438704.1	n/d
	11	EA-ED0512	<i>Bacillus cereus</i>	97	KY454692.1	Negativo
	10	EA-ED0513	<i>Paenibacillus</i> sp.	100	KU891834.1	Negativo
	2	EA-ED0516	No identificada	n/d	n/d	n/d
	12	EA-ED0517	<i>Bacillus subtilis</i>	96	KY285264.1	Positivo
	2	EA-ED0520	<i>Bacillus</i> sp.	99	CP17763.1	Positivo
	13	EA-ED0521	<i>Microbacterium</i> sp.	99	KU198775.1	n/d
	14	EA-ED0524	<i>Staphylococcus</i> sp.	99	KF777659.1	n/d
	9	EA-ED0525	<i>Bacillus subtilis</i>	100	KJ872853.1	Negativo
	15	EA-ED0526	<i>Micrococcus</i> sp.	100	HM163485.1	n/d
	1	EA-ED0527	<i>Bacillus subtilis</i>	100	KR560045.1	Negativo
	12	EA-ED0528	<i>Bacillus subtilis</i>	99	LN907748.1	Negativo
	9	EA-ED0535	<i>Bacillus</i> sp.	95	CP018295.1	Positivo
	18	EA-ED0536	<i>Pseudomonas</i> sp.	95	JN871227.1	n/d
	10	EA-ED0537	<i>Paenibacillus</i> sp.	98	KF010797.1	n/d
	1	EA-ED0538	<i>Bacillus</i> sp.	95	EU852051.1	Positivo
	9	EA-ED0546	<i>Bacillus</i> sp.	99	KT150238.1	Positivo
	16	EA-ED0547	<i>Paenibacillus</i> sp.	98	JX912488.1	n/d
	10	EA-ED0548	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	FJ006910.1	n/d
	17	EA-ED0486	<i>Bacillus subtilis</i>	100	KX664444.1	Negativo
	4	EA-ED0487	<i>Methylobacterium</i> sp.	100	JQ659457.1	n/d
AIA	5	EA-ED0488	<i>Micrococcus luteus</i>	98	K4534353.1	n/d
	6	EA-ED0489	<i>Micrococcus aloeverae</i>	100	KT900585.1	n/d
	7	EA-ED0490	<i>Microbacterium</i> sp.	99	LT223596.1	n/d

	4	EA-ED0491	<i>Methylobacterium</i> sp.	100	KT592237.1	n/d
	1	EA-ED0492	<i>Bacillus subtilis</i>	100	KY783604.1	Negativo
	4	EA-ED0493	<i>Methylobacterium</i> sp.	100	NR074244.1	n/d
	2	EA-ED0494	<i>Bacillus subtilis</i>	100	AB862123.1	n/d
	12	EA-ED0501	<i>Bacillus</i> sp.	99	HQ877784.1	Negativo
	9	EA-ED0502	<i>Bacillus subtilis</i>	99	KU230021.1	Negativo
	11	EA-ED0503	<i>Bacillus subtilis</i>	99	KU173952.1	Positivo
	9	EA-ED0504	<i>Bacillus cereus</i>	100	CP014486.1	Negativo
	12	EA-ED0505	<i>Bacillus subtilis</i>	100	KX610178.1	Positivo
	10	EA-ED0532	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	DQ870733.1	Negativo
	16	EA-ED0533	<i>Paenibacillus</i> sp.	100	KJ438704.1	n/d
	16	EA-ED0534	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	EU937966.1	n/d
	16	EA-ED0539	<i>Paenibacillus</i> sp.	97	KR029220.1	n/d
	10	EA-ED0540	<i>Paenibacillus</i> sp.	98	KJ438704.1	n/d
YDC	9	EA-ED0495	<i>Bacillus licheniformis</i>	100	JN998708.1	Negativo
	1	EA-ED0496	<i>Bacillus subtilis</i>	100	FJ392729.1	Negativo
	2	EA-ED0497	<i>Bacillus subtilis</i>	100	KY400283.1	Positivo
	4	EA-ED0498	<i>Methylobacterium</i> sp.	100	CP016640.1	n/d
	11	EA-ED0499	<i>Bacillus cereus</i>	97	JQ312044.1	Negativo
	1	EA-ED0500	<i>Bacillus subtilis</i>	100	KY608128.1	Negativo
	9	EA-ED0514	<i>Bacillus subtilis</i>	98	KU200357.1	Positivo
	1	EA-ED0515	<i>Bacillus subtilis</i>	99	KJ872538.1	Positivo
	9	EA-ED0518	<i>Bacillus subtilis</i>	98	KF853121.1	Positivo
	1	EA-ED0519	<i>Bacillus subtilis</i>	99	KT341978.1	Positivo
	2	EA-ED0522	<i>Bacillus subtilis</i>	97	EF150885.1	Negativo
	9	EA-ED0523	<i>Bacillus subtilis</i>	99	KX664444.1	Positivo
	9	EA-ED0530	<i>Bacillus</i> sp.	98	JX406822.1	Positivo
	1	EA-ED0531	<i>Bacillus subtilis</i>	98	KR183875.1	Positivo

	9	EA-ED0542	<i>Bacillus</i> sp.	99	EU489517.1	Negativo
	10	EA-ED0543	<i>Bacillus subtilis</i>	97	KP966505.1	Negativo
	9	EA-ED0544	<i>Bacillus subtilis</i>	98	KU510073.1	Positivo
	1	EA-ED0545	<i>Bacillus subtilis</i>	97	KU510073.1	Positivo
PIA	18	EA-ED0529	<i>Pseudomonas</i> sp.	99	KY490127.1	n/d
	18	EA-ED0541	<i>Pseudomonas</i> sp.	98	JN871227.1	n/d

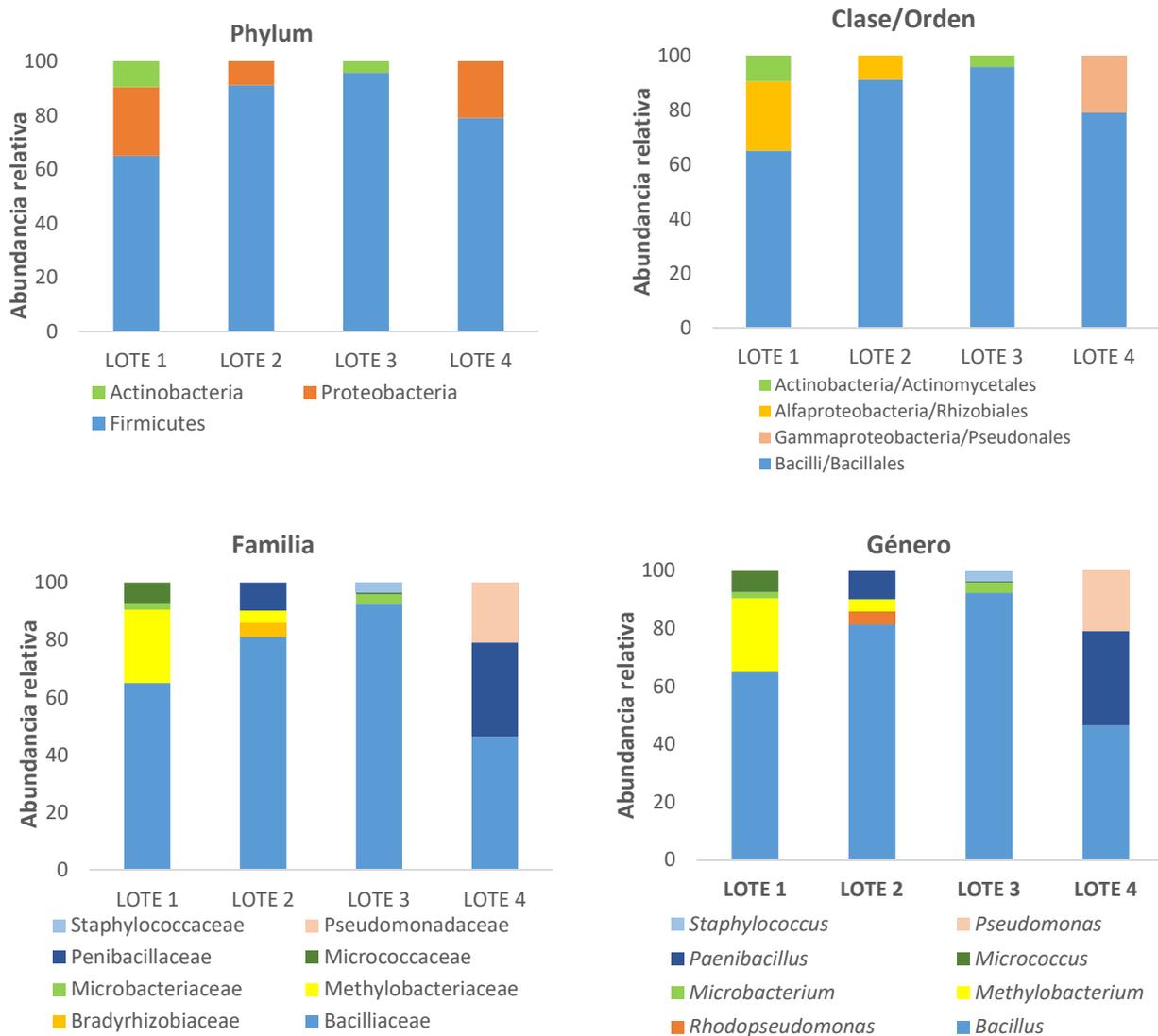
*n/d: no determinado

Se encontraron 18 morfologías entre este grupo de aislados (Anexo IX), de las cuales 6 correspondieron a morfologías de organismos identificados como *B. subtilis*, 2 morfologías para las cepas como *Paenibacillus*, 1 para las *Pseudomonas*, 1 para *Methylobacterium*, 3 para *Microbacterium*, 2 para *Micrococcus*, 1 para *Rhodopseudomonas*, 1 para *Staphylococcus* y 1 para *Rhodothorula mucilaginosa*, esta última no se tuvo en cuenta para los análisis de diversidad debido a su naturaleza fúngica. Se determinó que del total de cepas aisladas de los lotes 1 al 4 (69 cepas), el 63,77% (44) corresponden a microorganismos del género *Bacillus*. De estas, 31 fueron identificadas como *B. subtilis* y de ellas 19 hibridaron con la sonda Bs575.

Con el tamaño de la población de cada aislado (UFC/ g de raíz) en cada lote y su identificación molecular, se determinó la abundancia relativa de los phylum, clases, órdenes, familias y géneros taxonómicos a los cuales corresponde la microbiota identificada (Figura 6-2). Se determinó una alta proporción de Firmicutes en los diferentes lotes (entre el 65,1-95,9%), la presencia de Proteobacterias en tres de los cuatro lotes evaluados, y en dos de los cuatro lotes se encontraron Actinobacterias. Esto es correspondiente en proporción a las cantidades encontradas por clase y orden, en donde los Bacillales/Bacilli son los organismos de mayor proporción en los 4 lotes, seguido de Afaproteobacteria/Rhizobiales presentes en los lotes 1 y 2, las Gamaproteobacterias/Pseudomonadales en el lote 4, y las Actinobacteria-actinomycetales en el lote 1 y 3. El evaluar la abundancia relativa de la familia y género se determinó una mayor proporción de miembros de la familia Bacillaceae-Género *Bacillus* en los cuatro lotes. Las demás familias/géneros encontradas fueron dependientes del lote, encontrando Paenibacillaceae/*Paenibacillus* en el lote 2 y 4, Methylobacteriaceae/*Methylobacterium* sp. en el lote 1 y 2, Micrococcaceae/*Micrococcus* sp. y Microbacteriaceae/*Microbacterium* sp. en

los lotes 1 y 3, *Bradyrhizobiaceae/Rhodopseudomonas* sp. en el lote 2, *Staphylococcaceae/Staphylococcus* sp. en el lote 3, y *Pseudomonadaceae/Pseudomonas* sp. en el lote 4.

Figura 6-2. Abundancia relativa de microorganismos endófitos que componen la microbiota endófito nativa de las raíces de plantas de banano cultivadas a nivel *in vitro*.



Esta variabilidad entre lotes sugiere que existen diferencias en la microbiota nativa inherentes al lote, que podría provenir de los diferentes meristemos empleados para el desarrollo del cultivo *in vitro*. En vista de las diferencias entre lotes encontradas se procedió a realizar los análisis de diversidad microbiana presente en las muestras de las raíces de

banano provenientes de los lotes 1, 2, 3 y 4. Se desarrolló el análisis de α y β diversidad para la microbiota encontrada.

Tabla 6-2. Análisis de diversidad microbiana α y β para los lotes de plantas de banano cultivadas a nivel *in vitro*

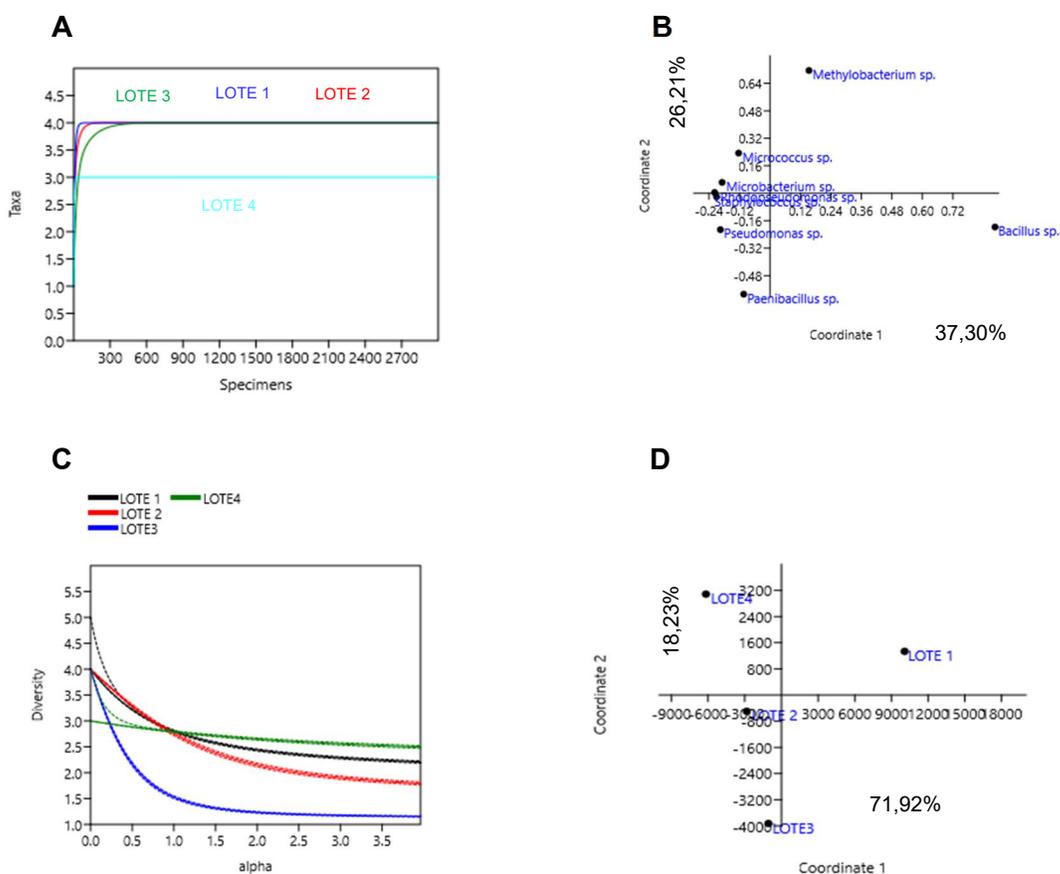
Parámetro	LOTE 1	LOTE 2	LOTE3	LOTE4		
Diversidad α						
Riqueza S	4	4	4	3		
Individuos	3,24*10 ⁴	1,52*10 ⁴	1,42*10 ⁴	1,80*10 ⁴		
Simpson (1-D)	0,59	0,53	0,19	0,62		
Shannon (H)	1,03	1,01	0,42	1,03		
Berger-Parker	0,53	0,65	0,90	0,46		
Análisis diversidad t /permutación	1-2*	2-3*	3-4*	3-1*	4-1*	2-4*
Diversidad β						
Índice de Whittaker	1,13					

* La prueba presenta diferencias estadísticamente significativas respecto a la diversidad de los lotes evaluados por medio de los índices de Shannon (H) y de Simpson (1-D).

Se determinó que existen diferencias significativas en la diversidad entre los lotes evaluados por medio de un análisis de permutación de diversidad, complementado con un análisis de diversidad t para los índices Shannon y Simpson. El análisis de diversidad presentado muestra una baja riqueza microbiana representada en el número de especies por lote, S. Se determinó una mayor cantidad de individuos/g de raíz para el lote 1, mientras que los otros lotes presentaron una cantidad de individuos cercana. Se determinó una dominancia de 0,41; 0,47; 0,81 y 0,38 para los lotes 1, 2, 3 y 4 respectivamente, indicando que existe esa probabilidad de que al aislar aleatoriamente un individuo de la muestra se obtenga el mismo grupo taxonómico. De acuerdo a esto, la mayor dominancia se presenta en el lote 3, en el cual *Bacillus* fue el género dominante. La menor dominancia se encontró en el lote 4, en el cual los géneros *Bacillus* y *Paenibacillus* comparten la mayor abundancia relativa. Esto se corroboró con el índice de Berger-Parker. Por su parte, el índice de Shannon calculado para cada lote presenta valores entre 0,42 – 0,98 indicando que la incertidumbre para predecir a qué taxón corresponderá un microorganismo al seleccionarlo al azar entre un grupo de taxones, estará entre esos valores; siendo 1,38 (ln(S)) el máximo valor que podría tomar este índice de acuerdo a la riqueza de especie que se encuentra en las muestras. El análisis de diversidad t entre las parejas de lotes presentadas determinó que existen diferencias significativas en los índices obtenidos para cada lote, tanto el de Shannon como el de Simpsons. Esta prueba estadística permite determinar que los lotes

no son iguales en abundancia y diversidad de los microorganismos nativos presentes. Se realizó además el análisis de diversidad β para los diferentes lotes, el cual arrojó un valor de índice de Whittaker de 1,13. Este valor indica que a pesar de la variabilidad local en los lotes, existe una alta homogeneidad de las comunidades presentes en el grupo de lotes evaluados; encontrando a nivel general alta similitud entre especies y poca biodiversidad. A continuación se presenta el análisis de rarefacción realizado para cada uno de los lotes de plantas evaluados, junto con los análisis PCoA realizado para los lotes y los géneros encontrados, con el fin de conocer si existe algún componente que pueda explicar la variabilidad de la diversidad encontrada. Se presentan además las curvas de perfil de diversidad (Figura 6-3).

Figura 6-3. Análisis de rarefacción, PCoA's y curvas de perfil para la diversidad microbiana endófitra de los lotes de banana Williams cultivados a nivel *in vitro*.



A: Curvas de análisis de rarefacción de individuos por lote de banana muestreado. **B.** Análisis de coordenadas principales (PCoA) para los géneros e individuos colectados en los diferentes lotes de banana. **C.** Curvas de

perfil de diversidad (con base en los de Renyi's) **D.** Análisis de coordenadas principales (PCoA) para la diversidad encontrada en los lotes de banano *in vitro* evaluados.

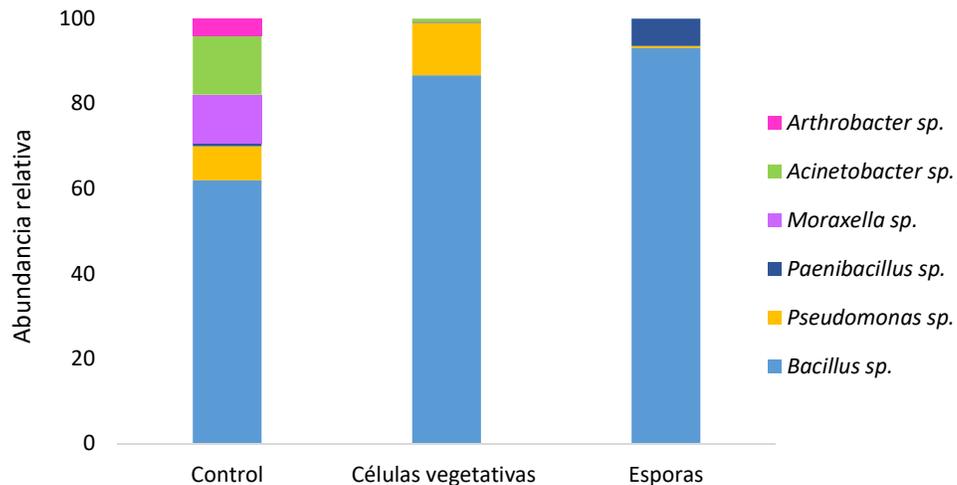
La Figura 6-3A presenta el análisis de rarefacción en el cual es posible comparar la riqueza de los lotes, a pesar de la diferencia de taxones y de individuos entre ellos. Se observa una rápida aparición de una fase estacionaria en la gráfica, lo cual es indicativo de que la muestra fue estudiada hasta su máximo de taxones cultivables presentes, 3 ó 4 según el lote. Esto revela que el esfuerzo de muestreo fue suficiente para determinar las especies presentes y que la riqueza de las muestras es baja. Adicionalmente, se presenta el análisis de coordenadas principales (PCoA) para la diversidad de géneros microbianos determinados en los lotes (Figura 6-3B). Se observan diferencias en su agrupación, donde los componentes de los ejes representan tan sólo un 37,3% para el componente 1 y un 26,2% para el componente 2, indicando que la variabilidad del sistema no puede ser bien explicada por variables claves desarrolladas por el análisis de ordenación. Esto indicaría la no existencia de patrones de variabilidad fácilmente explicables para la diversidad de los lotes. Sin embargo, se encuentra que los géneros con mayor proporción en los análisis de abundancia relativa (*Bacillus* sp., *Paenibacillus* sp. y *Methylobacterium* sp.) presentan una agrupación diferencial respecto al cluster de géneros de menor representación. Se presenta la curva de perfiles de diversidad para los lotes evaluados, en la cual se determina similitud entre los lotes, con perfiles muy parecidos. Sin embargo, el lote 4 presenta una tendencia levemente diferente a los otros tres, debido probablemente a su menor dominancia y menor riqueza de especies, presentando una pendiente menor que los otros lotes. Se realizó el análisis PCoA para los lotes, se determinó que los lotes 1, 2 y 3 pueden agruparse de acuerdo al componente 1, el cual explica un 71,9% la variabilidad del sistema; mientras que el lote 4 no se agrupa con los otros tres. El análisis del componente 2 indica que tan sólo explica la variabilidad en un 18,2%.

6.4.2 La aplicación del microorganismo *B. subtilis* EA-CB0575 en las raíces de las plantas de banano *in vitro* enmascara las poblaciones nativas presentes.

Con el fin de determinar el efecto de la aplicación de *B. subtilis* EA-CB0575 sobre la población y diversidad microbiana de las raíces de banano, se aislaron los microorganismos endófitos presentes en plantas con y sin aplicación de *Bacillus* a los 7 DDI. La microbiota resultante encontrada e identificada por la secuenciación del gen 16S rRNA permitió determinar la presencia de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Paenibacillus*, *Moraxella*, *Acinetobacter* y *Arthrobacter*, los tres primeros previamente encontrados en los lotes 1,2,3

y 4 evaluados previamente. Los géneros mencionados se encontraron en plantas control. Los géneros *Moraxella*, *Acinetobacter* y *Arthrobacter* no se habían encontrado en los lotes antes evaluados, pero podrían ser parte de una fracción variable de la microbiota, adicionalmente, estas bacterias pertenecen a órdenes taxonómicos previamente encontrados, Actinomycetales para *Arthrobacter* y Pseudomonadales para *Moraxella* y *Acinetobacter*. Los tratamientos con aplicación del microorganismo (células vegetativas y esporas de *B. subtilis* EA-CB0575 a una concentración de 1×10^8 UFC/mL) fueron evaluados respecto a su diversidad microbiana, encontrando una alta proporción de *Bacillus* en las raíces de estas plantas evaluadas, mientras que otros géneros presentes se hacen casi imperceptibles. Esto sugiere un efecto de enmascaramiento de las otras poblaciones debido a la alta concentración de *Bacillus* en la planta (Figura 6-4). Este efecto podría deberse a dos factores: el primero podría ser una desinfección ineficiente de las raíces, lo que en realidad no logra eliminar los microorganismos inoculados, ya sean como esporas o células vegetativas. Esta teoría toma fuerza debido al hecho de trabajar con microorganismos formadores de endosporas, las cuales son altamente resistentes a condiciones de estrés ambiental y químico. El segundo es la posibilidad de que el microorganismo module la microbiota presente en las plantas debido a su capacidad de producción de antibióticos y a su necesidad de competir por nutrientes y espacio, lo que podría relacionarse además con su capacidad de colonización de la raíz.

Figura 6-4. Abundancia relativa de microorganismos que componen la microbiota nativa de plantas de banano cultivadas a nivel *in vitro*



Con el fin de evaluar el impacto que puede presentarse por la aplicación del microorganismo *B. subtilis* EA-CB0575 sobre la microbiota nativa presente en las plantas de banano, se realizó el análisis de diversidad de las plantas con y sin aplicación (Tabla 6-3).

Tabla 6-3. Análisis de diversidad α y β para los tratamientos con y sin aplicación de *B. subtilis* EA-CB0575

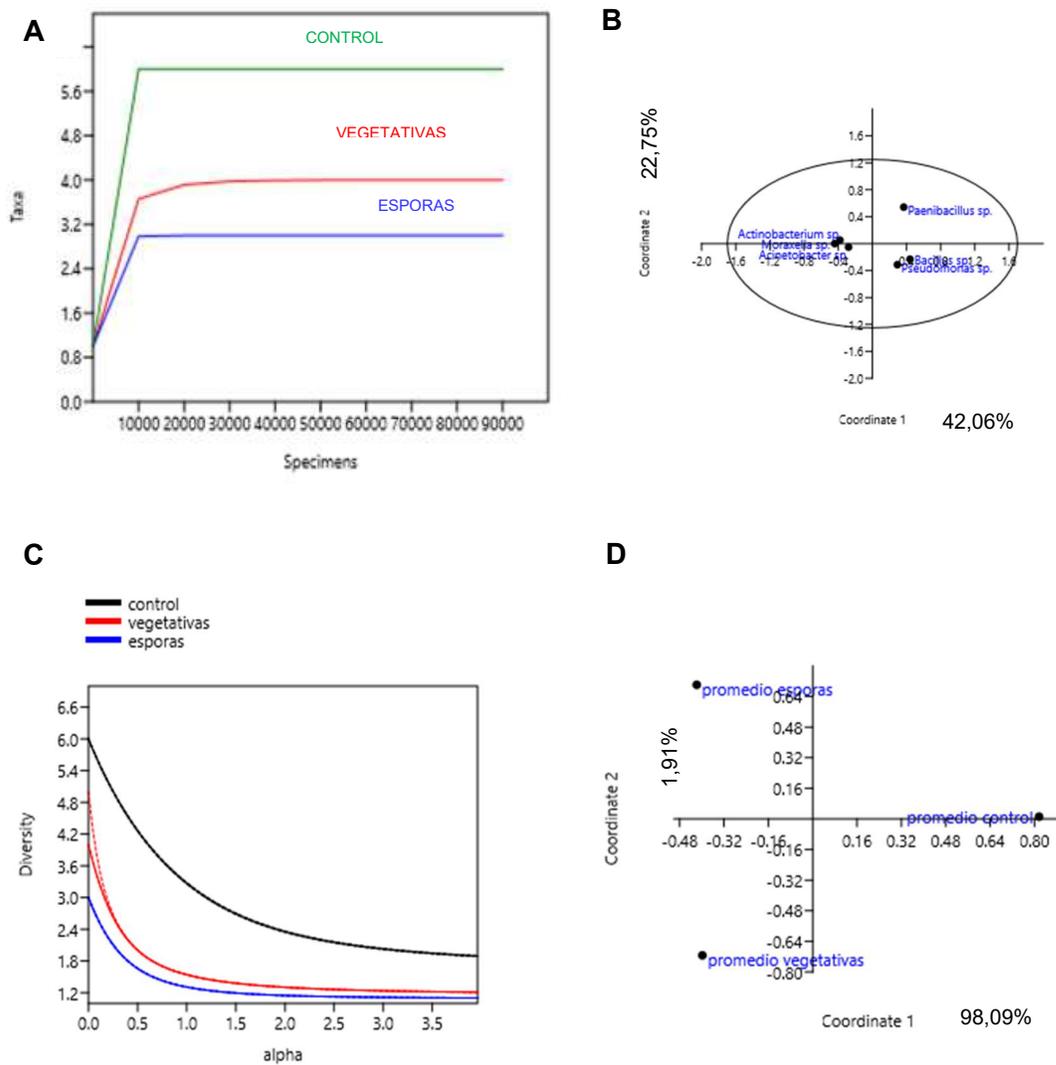
Parámetro	Control	Células vegetativas	Esporas
Diversidad α			
Riqueza S	6	4	3
Individuos	$2,5 \cdot 10^5$	$5,4 \cdot 10^6$	$5,7 \cdot 10^6$
Dominancia (D)	0,42	0,77	0,87
Simpson (1-D)	0,58	0,23	0,13
Shannon (H)	1,19	0,43	0,27
Berger-Parker	0,62	0,87	0,93
Análisis diversidad t /permutación	Cont-veg*	Veg-espo*	Espo-cont*
Diversidad β			
Índice de Whittaker	0,38		

* La prueba presenta diferencias estadísticamente significativas respecto a la diversidad de los lotes evaluados por medio de los índices de Shannon (H) y de Simpson (1-D).

Se observa que la riqueza (S) se reduce en los tratamientos con la aplicación del microorganismo, mientras que en el control se encontraron 6 taxas, en los otros tratamientos tan sólo 4 y 3. Esto es el primer indicativo de que el microorganismo puede estar generando un efecto sobre las poblaciones nativas en las plantas. Adicionalmente, se encuentra que los tratamientos donde el *Bacillus* fue aplicado presentan una alta dominancia (D), entre 0,77-0,87, mientras que en el control sin aplicación este índice es tan sólo 0,42. El índice de diversidad de Shannon del control es superior al de los tratamientos inoculados, para los que ese valor es de 0,43 y 0,27 para la aplicación de células vegetativas y esporas, respectivamente; indicando media y baja incertidumbre para predecir de qué taxón sería un microorganismo aislado de la muestra. Se evaluó la diversidad β y se encontró un valor del índice de Whittaker de 0,38, indicando que son pocos los microorganismos que se comparten o recambian entre las muestras; lo cual es sinónimo de alta diferenciación a nivel regional. Se realizaron análisis de rarefacción, curvas de perfil de diversidad y análisis PCoA para aportar en dilucidación del efecto de la aplicación del microorganismo en las raíces a nivel *in vitro* (Figura 6-5). En la curva de rarefacción se observa la riqueza de las muestras, lo cual coincide con lo previamente enunciado por los

índices de diversidad, se observa una mayor riqueza para el control sin inoculación de la bacteria, seguida del tratamiento con aplicación de células vegetativas y posteriormente con aplicación de esporas.

Figura 6-5. Análisis de rarefacción, PCoA y curvas de perfil para la diversidad endófitra de los tratamientos con y sin aplicación del microorganismo *B. subtilis* EA-CB0575.



A: Curvas de análisis de rarefacción de individuos por lote de banano muestreado. **B.** Análisis de coordenadas principales (PCoA) para los géneros e individuos colectados en los diferentes lotes de banano. **C.** Curvas de perfil de diversidad (con base en los de Renyi's) **D.** Análisis de coordenadas principales (PCoA) para la los tratamientos aplicados a de banano *in vitro*.

Se observa una baja riqueza en las muestras, la cual se reduce aún más cuando se aplica el microorganismo a las raíces. En el análisis de rarefacción se muestra que el muestreo

alcanza la fase Platau (Figura 6-5), indicativo de que las especies cultivables que se encuentran en la muestra fueron analizadas en su totalidad e indicativo de que el esfuerzo de muestreo es el adecuado para el proceso. En el análisis PCoA para los géneros presentes se determinó que los componentes 1 y 2 del análisis ordinal permiten explicar tan sólo un 42,1% y un 22,8% la variación entre los géneros encontrados. Se encuentra que *Bacillus*, *Paenibacillus* y *Pseudomonas*, los géneros de mayor proporción en las muestras de estos lotes evaluados, están separados de los géneros de menor proporción. El análisis por curvas de perfil de diversidad muestra un cambio drástico en la cantidad de taxones presentes en las muestras y en la dominancia de los taxones presentes para las muestras inoculadas. El control presenta una curva característica de especies bien distribuidas y con baja dominancia, mientras que los tratamientos con el microorganismo presentan una curva característica de una alta dominancia y poca distribución de las especies presentes. Por medio del análisis PCoA se encontró que la variabilidad de los tratamientos puede ser altamente explicada por el componente 1 (98,1%), lo cual genera una agrupación de los puntos alrededor del eje e indicando que la variabilidad puede explicarse en su totalidad por un factor en común, en este caso podría suponerse que la aplicación de la PGPR puede ser ese factor.

6.5 Discusión

La presencia de microorganismos endófitos ha sido ampliamente reportada para diversos cultivos (Gaiero et al., 2013) pero son pocos los reportes sobre microorganismos endófitos de cultivos *in vitro* (Quambusch et al., 2014). Este trabajo se orientó a determinar la microbiota endófito nativa cultivable presente en las plantas de banano variedad Williams producido a nivel *in vitro*, y a realizar un análisis de diversidad para las poblaciones presentes en las plantas. Se determinó que existe una porción de la microbiota común entre las plantas, especialmente microorganismos pertenecientes al género *Bacillus*; una porción de microorganismos que pueden estar en mayor proporción, como es el caso de *Pseudomonas*, *Methylobacterium* y *Paenibacillus*, y una porción de microorganismos que es muy variable y que puede estar compuesto por especies de géneros como *Micrococcus*, *Microbacterium*, *Staphylococcus*, *Rhodopseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Arthrobacter* y otros que posiblemente no fueron detectados en este estudio debido a su

carácter no cultivable o a su baja proporción en las muestras. Todos los géneros reportados hacen parte de microorganismos comúnmente presentados en plantas y pertenecientes a los Phylum Firmicutes, Actinobacterias y Proteobacterias (Bulgarelli et al., 2013).

La presencia de *Bacillus* como endófitos predominantes de los cultivos *in vitro*, los cuales provienen de explantes que han pasado una serie de procesos de desinfección para su propagación, sugiere que esto podría deberse a la capacidad de resistencia de estos microorganismos a condiciones de estrés, como las existentes en un ambiente sometido a agentes químicos empleados en los procesos de desinfección rutinarios. Se propone que estos pasos de desinfección podrían seleccionar una microbiota “núcleo” compuesta de microorganismos de los géneros *Bacillus* y *Paenibacillus*, formadores de endosporas, y los representantes de la mayor proporción en este estudio de diversidad de banano. Otros microorganismos menos resistentes como los pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Methylobacterium* y *Acinetobacter* podrían presentarse debido a que a pesar de ser menos resistentes, algunos podrían soportar las condiciones y empezar un proceso de adaptación, en el que su capacidad de colonización juega un papel importante. Se han reportado evaluaciones de microbiota nativa de plántulas *in vitro* donde algunos de estos géneros enunciados son protagonistas, y en los que se ha determinado su capacidad de colonización de plántulas (Quambusch et al, 2013; Egamberdieva et al., 2015; Orlikowska et al., 2016; Thomas et al., 2016).

Del total de microorganismos identificados en los lotes 1 al 4, se determinó que el 65% de las cepas pertenecen al género *Bacillus*, y entre ellas 31 fueron identificadas según la homología con las secuencias depositadas en las bases de datos como *B. subtilis*. Se empleó el método FISH con la sonda específica de *B. subtilis*, previamente desarrollada en este proyecto, y se determinó que sólo 19 de estos microorganismos hibridaron; lo cual deja en duda su precisa identificación. A pesar de que los análisis de diversidad microbiana α presentaron una alta variabilidad entre los taxones que componen los diferentes lotes evaluados, el análisis β presentó una similitud entre los componentes de los lotes a nivel general, lo cual corresponde a un índice cercano a 1, donde la relación entre la diversidad gamma y la alfa indican similitud entre las comunidades analizadas. Esto implica que a nivel global las especies encontradas son similares.

Contrario a lo presentado en otros trabajos sobre el tema de microbiota nativa de banano (Koberl et al., 2015; Rossmann et al., 2012), los resultados de esta investigación presentan

una microbiota nativa dominada por Firmicutes principalmente, entre tanto, esas investigaciones reportan una dominancia del Phylum Proteobacteria específicamente de la familia Enterobacteriaceae y Pseudomonaceae; y géneros como *Klebsiella*, *Escherichia*, *Rauoltella*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, muchos de ellos patógenos humanos u oportunistas. Sin embargo, la etapa fenológica del cultivo, el lugar de colecta, y sistema de siembra empleado pueden ser factores claves para la definición de este microbioma. Un estudio similar al nuestro desarrollado por Thomas et al., (2008), expone también la existencia de poblaciones nativas de bacterias en las plántulas de banano *in vitro*, indicando una alta prevalencia de géneros como *Acinetobacter* y *Serratia*, y reportando la presencia de otros géneros como *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Micrococcus* y otros también reportados en este proyecto. Las evidencias demuestran que existe una microbiota relacionada a las plantas de banano *in vitro*, el cual podría ser empleado para modular actividades de nutrición, defensa y desarrollo vegetal.

Se evaluó el efecto de la aplicación de *B. subtilis* EA-CB0575 sobre las poblaciones nativas de banano a nivel *in vitro* a los 7 DDI. Se determinó que la presencia de la PGPR afecta la diversidad y abundancia de especies presentes en el cultivo, lo cual se evidenció por medio del cambio en la composición de microbiota aislada de la planta después de la inoculación, el cual consistió en menor cantidad de géneros detectados y menor cantidad de UFC/g de raíz detectadas. Este efecto podría deberse a la capacidad de colonización del microorganismo ya sea a nivel endófito o epífita, o ambas, que genere una competencia por espacio con los otros microorganismos presentes, modulación en la microbiota de la planta de acuerdo a procesos de señalización con la planta ó a producción de compuestos antibióticos que generen antagonismo con la microbiota nativa. Sin embargo, este último ítem fue probado frente a algunos de los microorganismos endófitos y no se presentó antagonismo a nivel *in vitro* (datos no mostrados). Se sugiere continuar los estudios evaluando cuál es el efecto de la aplicación de las PGPR's en la planta pero en diferentes tiempos, lo que permitiría acercarse más al conocimiento de las interacciones entre la planta y estos microorganismos. Así mismo sería de interés conocer el efecto de la aplicación de *Bacillus* no sólo sobre las poblaciones cultivables sino también de no cultivables, para lo que los estudios metagenómicos podrían ser de gran ayuda. Estudios en el tema han presentado resultados contradictorios empleando diferentes técnicas, algunos arrojan como resultado un efecto neutro de la aplicación de microorganismos en diferentes cultivos, otros indicando efecto negativo para la abundancia poblacional y otros demostrando el aumento

de la actividad microbiana en los suelos (Castro-Sowinski et al., 2007), sin embargo, la unión de la información obtenida por métodos cultivables y relacionada a los resultados metagenómicos, podría brindar un panorama mas real y amplio de los que sucede con la biodiversidad microbiana presente en los cultivos de tejidos al aplicar inoculantes biológicos.

6.6 Conclusiones

En este estudio se reporta la composición de la microbiota nativa de la planta de banano cultivado a nivel *in vitro* y asociada a la rizosfera del cultivo. Se determinó que entre el 46,4%-92,4% de la microbiota presente son *Bacillus*, y una porción menor está constituida por géneros como *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Rhodopseudomonas*, *Microbacterium*, entre otros, pertenecientes a los diferentes familias de los phylum Firmicutes, Proteobacteria y Actinobacteria. Se determinó diferencias en la diversidad α de los lotes de plantas pero una diversidad β que indica similitud global en la diversidad de los lotes. Adicionalmente, se evaluó el efecto que genera la aplicación del microorganismo *B. subtilis* EA-CB0575 en las poblaciones nativas de las plantas de banano, determinando que la aplicación de la bacteria enmascara las poblaciones presentes en menor proporción, con un impacto en la reducción del número de especies encontradas y en su abundancia, lo que podría deberse a la alta dominancia de la cepa PGPR, luego de su aplicación en la planta.

7. Conclusiones y Recomendaciones

7.1 Conclusiones

En este estudio se secuenció, ensambló y realizó el análisis del genoma de *B. subtilis* EA-CB0575. Se determinó que el microorganismo tiene un genoma de 4,2 Mb, el cual pudo ensamblarse en 16 contigs. Se evaluó la presencia de algunos de los genes relacionados con los mecanismos de promoción de crecimiento vegetal y se determinó que la cepa posee genes relacionados con la producción de AIA, sideróforos, LPs, solubilización de fosfatos, fijación de nitrógeno y producción de acetoína y 2,3 butanodiol.

De las evaluaciones bioquímicas de los rasgos PGPR se determinó que *B. subtilis* EA-CB0575 produce AIA, sideróforos, puede solubilizar fosfatos, fijar nitrógeno y producir los LPs surfactinas y fengicinas. Por medio de espectrometría de masas, se determinó que las *Bacillus* produce surfactinas con cadena polar entre C12 y C16, fengicinas A con cadena polar entre C14-C17 y fengicinas B C16 y C17.

Se determinó que *B. subtilis* EA-CB0575 promueve el crecimiento de las plantas de tomate Chonto y banano variedad Williams al emplear las esporas o células vegetativas del microorganismo. Las dos concentraciones del microorganismo evaluadas (1×10^7 y 1×10^8 UFC/mL) promueven el crecimiento de las plantas, pero la concentración 1×10^8 UFC/mL presenta resultados mas consistentes entre evaluaciones. Esta promoción se observó en los diferentes sustratos evaluados, a nivel *in vitro* e invernadero.

Se diseñó y evaluó una sonda basada en el 16S rRNA de *Bacillus subtilis* para ser empleada en los métodos FISH/CARD-FISH, esta sonda es específica para la especie *B. subtilis* y permite diferenciar entre microorganismos del clado *B. subtilis*. Además, presentó resultados exitosos en la detección del microorganismo en las raíces de banano y tomate.

B. subtilis EA-CB0575 fue detectado en las muestras de raíces de tomate y banano hasta a los 30 DDI empleando los métodos FISH/CARD-FISH con la sonda específica Bs575, y se determinó un aumento de las poblaciones de microorganismos detectadas en el tiempo. Debido a la presencia del microorganismo en alta proporción en las raíces, su aumento poblacional en el tiempo y la formación de matrices multicelulares en la raíz, se concluye que la cepa coloniza las raíces de los cultivos agrícolas en estudio.

Al evaluar la producción de LPs de las familias fengicinas y surfactinas en las raíces de banano se encontró la presencia de surfactinas con cadena polar entre C13- y C16 en las muestras estudiadas, pero no fue posible detectar fengicinas. La presencia de surfactinas en el control sin aplicación del microorganismo no permite atribuir la producción de estos compuestos al *B. subtilis* EA-CB0575 e indica que es posible la presencia de otros *Bacillus* de forma nativa en las raíces de banano.

Las vitro-plantas de banano presentan una microbiota endófitas compuesta en su mayoría por microorganismos de los géneros *Bacillus* y *Paenibacillus*. En menor proporción se presentan microorganismos de los géneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Methylobacterium*, *Microbacterium*, entre otros. La diversidad local en los lotes de banano *in vitro* evaluados presentó cambios en abundancia y en cantidad de especies, lo que se evaluó por medio de los índices de diversidad α Shanon y Simpson sin embargo, la diversidad regional (β) se considera sin cambios aparentes (valor de 1,13).

Cuando las plantas *in vitro* de banano son inoculadas con *B. subtilis* EA-CB0575 se reduce la diversidad y abundancia de los géneros bacterianos presentes en las plantas, encontrándose además una alta abundancia relativa de *B. subtilis* en las muestras.

7.2 Recomendaciones

En esta tesis doctoral se secuenció y ensambló el genoma del microorganismo *B. subtilis* EA-CB0575 y como resultado se obtuvo un genoma ensamblado en 16 contigs. Sin embargo, el operón de las NRP's para la producción de surfactinas quedó fraccionado y compartido entre los contigs 5 y 7, lo que también sucedió con el operón que codifica para la producción de las NRP's de fengicinas, ubicadas entre el contig 10 y 11. Por este motivo, se recomienda resecuenciar y reensamblar el genoma para reducir la cantidad de contigs y obtener completos los operones para producción de NRP's de los LPs enunciados.

Se recomienda emplear un método de detección, identificación y cuantificación para el estudio de las surfactinas y fengicinas en las raíces de las plantas de banano inoculadas y sin inocular con el microorganismo *B. subtilis* EA-CB0575, de esta manera se podrá determinar si existen diferencias en la cantidad de LPs producidos por el microorganismo en las raíces de las plantas, respecto de la cantidad producida por los microorganismos nativos en las raíces sin aplicación de la PGPR. Adicionalmente, el desarrollo de mutantes deficientes en la producción de surfactinas y fengicinas ó mutantes con la inserción de *gfp* en el operón que codifica la producción de NRP's de estos LPs, podría ayudar a la evaluación de la producción de estos compuestos en las raíces de los cultivos de interés.

En este proyecto se evaluó la aplicación del microorganismo PGPR *B. subtilis* EA-CB0575 en las plantas de banano variedad Williams y tomate variedad Chonto-Santa Cruz. Se recomienda evaluar el efecto en otras variedades del cultivo y determinar si la aplicación temprana del microorganismo genera efectos en la producción.

Se estudió la colonización del microorganismo empleando FISH y CARD-FISH, determinando la presencia del microorganismo en los ambientes estudiados. Sin embargo, se recomienda el uso de plataformas como CMEIAS y DAIME para cuantificar los resultados obtenidos por estos métodos. Adicionalmente se recomienda el uso de una sonda para eubacterias marcada con la enzima HRP con el fin de emplear el método CARD-FISH con la sonda Bs575, específica para *B. subtilis*, y con una sonda universal. Se recomienda dirigir la evaluación de los patrones de colonización a la zona de

maduración, de elongación y de diferenciación, realizando cortes histológicos de acuerdo a la diferenciación de células que se encuentran en estas zonas de la raíz.

Se sugiere continuar el estudio de formación de biopelícula del microorganismo *B. subtilis* EA-CB0575 evaluando qué componentes de la raíz pueden inducir la formación de esta matriz multicelular, qué componentes de los exudados de las plantas de banano o tomate son inductores de esta formación y si la adición de estos compuesto en los cultivos *in vitro* podría aumentar la colonización del microorganismo. Adicionalmente se recomienda generar mutantes de la cepa *B. subtilis* EA-CB0575 deficientes en la formación de biopelícula para indagar más a fondo el papel que los exudados y los extractos veegtales puedan tener sobre la formación de biopelícula.

Se hace necesario la evaluación de diferentes métodos de desinfección de las raíces inoculadas con *B. subtilis* para garantizar que la baja abundancia relativa de las poblaciones encontradas en las raíces después de la inoculación no se deba a la presencia de altas cantidades de la PGPR que no puedo ser eliminada de las muestras de estudio.

7.3 Producción bibliográfica

Posada, L.F., Alvarez, J.C., Hu, C.-H., de-Bashan, L.E., Bashan, Y. 2016a. Construction of probe of the plant growth-promoting bacteria *Bacillus subtilis* useful for fluorescence *in situ* hybridization. *Journal of Microbiological Methods*, 128, 125-129.

Posada, L.F., Ramírez, M., Ochoa-Gómez, N., Cuellar-Gaviria, T.Z., Argel-Roldan, L.E., Ramírez, C.A., Villegas-Escobar, V. 2016b. Bioprospecting of aerobic endospore-forming bacteria with biotechnological potential for growth promotion of banana plants. *Scientia Horticulturae*, 212, 81-90.

Anexos

Anexo I. Scripts empleados en extracción de genes codificantes de proteínas y para convertir alineamientos de formato FASTA a formato Phylip

extract_genes.py

Empleado para extraer genes codificantes de proteína de genomas en gbk

Lenguaje: Python. **Escrito por:** Nicolás Franco, Germán Santa María.

```
#!/usr/bin/env python
# Nicolas Franco Sierra 2/dic/2014
# extract_genes.py
# Dada una lista de genes y una de genomas, busca y extrae dichos genes
de cada uno de los genomas | output: un fasta por cada gen
# modo de uso: python extract_genes.py tabla_genes tabla_genomas
from Bio import SeqIO
import sys
input_genes = str(sys.argv[1])
input_genomas = str(sys.argv[2])
tabla_genes = open(input_genes, "r")
for line in tabla_genes:
    n = 0
    gen = str(line.split()[0])
    output = open(gen + ".fasta", "w")
    genomas = open(input_genomas, "r")
    print gen
    for line in genomas:
        flag = False
        genoma = str(line.split()[0])
        genoma_handle = open(genoma, "rU")
        for rec in SeqIO.parse(genoma_handle, "genbank"):
            if rec.features:
                for feature in rec.features:
                    if feature.type == "CDS" and ('gene'
in feature.qualifiers):
                        if gen ==
feature.qualifiers['gene'][0]:
                            output.write(">" +
rec.annotations['organism'] + "\n")

                            output.write(str(feature.location.extract(rec).seq) + "\n")
                            flag = True
```

```

        n += 1
        if flag:
            print "Extraido " + gen + " de " +
rec.annotations['organism'] + ". Van: " + str(n)
        else:
            print "No se encontro " + gen + " en " +
rec.annotations['organism']
            output.write(">" + rec.annotations['organism'] + "\n
\n")
        genoma_handle.close()
    output.close()
    genomias.close()

```

fasta2phy.py

Empleado para convertir alineamientos de formato FASTA a formato Phylip

Lenguaje: Python. **Escrito por:** Nicolás Franco, Germán Santa María.

```

#!/usr/bin/env python
# fasta2phy.py
# Escrito por Nicolas D. Franco Sierra
# Universidad EAFIT, mayo/2015
# Convierte un alineamiento de formato FASTA a formato Phylip
# Modo de uso: fasta2phy.py alineamiento_entrada.fasta
# alineamiento_salida.phy
import sys
from Bio import SeqIO
def length_counter(fasta):
    first_record = SeqIO.parse(open(fasta, "rU"), "fasta").next()
    return len(first_record.seq)
def taxa_counter(fasta):
    num_taxa = 0
    for record in SeqIO.parse(open(fasta, "rU"), "fasta"):
        num_taxa += 1
    return num_taxa
input_file = sys.argv[1]
output_file = sys.argv[2]
o = open(output_file, "w")
n_taxa = taxa_counter(input_file)
matrix_len = length_counter(input_file)
o.write(str(n_taxa) + " " + str(matrix_len) + "\n")
for record in SeqIO.parse(open(input_file, "rU"), "fasta"):
    o.write(str(record.id) + "\t" + str(record.seq) + "\n

```

Anexo II. Tablas de iones precursores para surfactinas y fengicinas A y B.

SURFACTINAS					
C12 surfactina	198,31	993,79	994,79	[M+H] ⁺	n/d
			1016,78	[M+Na] ⁺	n/d
			1032,89	[M+K] ⁺	n/d
C13 surfactina	212,34	1007,81	1008,81	[M+H] ⁺	<u>iones y:</u> 667,46 → 554,35 → 441,27→342,23→227,17
					<u>iones b:</u> 895,57 → 667,46→ 568,40 → 455,31→342,23
					<u>iones b-H₂O:</u> 764,48→324,21
					<u>iones b+H₂O:</u> 685,45→586,37
					<u>iones a:</u> 119,18
					<u>ion inmonium:</u> 86,10
					<u>iones y:</u> 441,27→342,23→227,17
					<u>iones b:</u> 917,56 →804,47
					<u>Fragmentos Mc Lafferty:</u> 958,66→714,48
					795,47
C14 surfactina	226,21	1021,68	1022,68	[M+H] ⁺	<u>iones y:</u> 667,42→ 554,35 → 441,27→227,17
					<u>iones b:</u> 909,59 → 796,506→ 582,41 → 469,33→356,24→227,17
					<u>iones b-H₂O:</u> 891,59→338,23
					<u>iones b+H₂O:</u> 685,45→586,37
					<u>ion inmonium:</u> 86,10
					<u>Ion Marcador surfactinas H⁺:</u> 685,45
					1044,67

				<u>lones b:</u> 931,57→818,49
				<u>lones b-H₂O:</u> 800,48→685,46
				<u>lones a:</u> 463,25
				<u>Fragmentos Mc Lafferty:</u> 972,69→728,49
		1060,78	[M+K] ⁺	n/d
C15 surfactina	240,39	1035,87	[M+H] ⁺	<u>lones y:</u> 667,43→554,35→441,27→342,27→227,17
				<u>lones b:</u> →923,61→810,53→596,43→483,34→370,26
				<u>lones b-H₂O:</u> 352,24
				<u>lon inmonium:</u> 86,10
				<u>lon Marcador surfactinas H⁺:</u> 685,45
				<u>lones y:</u> 342,27
				<u>lones b:</u> 945,59→832,50→505,37→392,27→263,2
1058,86	[M+Na] ⁺	<u>lones b-H₂O:</u> 814,50→600,41		
			<u>Fragmentos Mc Lafferty:</u> 986,69→742,51	
		1074,97	[M+K] ⁺	n/d
		1050,90	[M+H] ⁺	n/d
C16 surfactina	254,42	1049,90	[M+Na] ⁺	<u>lones y:</u> 343,27
				<u>lones b:</u> 959,59→846,51→406,79
				<u>lones b-H₂O:</u> 828,51
				<u>lones a:</u> 434,44
		1089,00	[M+K] ⁺	n/d

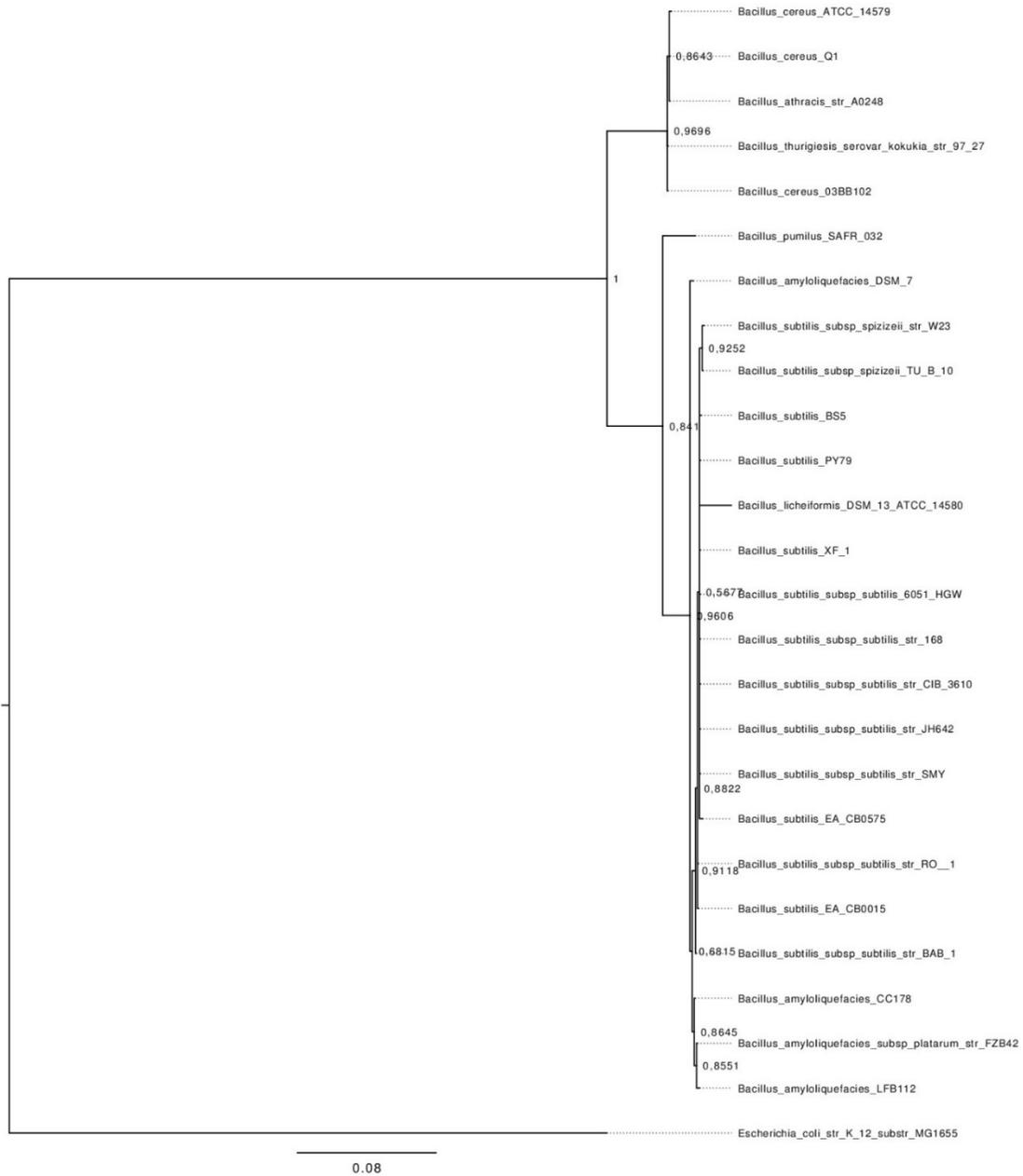
*MW: corresponde a peso molecular.

FENGICINAS						
FRACCIÓN	MW* Fracción apolar (Da)	MW* oligopéptido (Da)	MW* (Da)	iones precursores m/z	[M+X] ⁺	Productos iónicos (m/z)
C12	198,31		1407,22	1408,22	[M+H] ⁺	n/d
				1430,20	[M+Na] ⁺	n/d
				1446,32	[M+K] ⁺	n/d
C13	212,34		1421,24	1422,24	[M+H] ⁺	n/d
				1444,23	[M+Na] ⁺	n/d
				1460,34	[M+K] ⁺	n/d
C14	226,21		1435,11	1436,11	[M+H] ⁺	<u>iones y:</u> 1080→965,29→502,11 <u>iones b:</u> 1159→934,66→227,43 <u>iones y-NH₃:</u> 1063,50; 949,45
				1458,10	[M+Na] ⁺	n/d
				1474,21	[M+K] ⁺	n/d
						<u>iones y:</u> 1080,32→965,32→502,12 <u>iones b:</u> →949,671→242,43 <u>iones y-NH₃:</u> 1063,5 <u>ion a:</u> 938,46
C15	240,39	1208,90	1449,30	1450,30	[M+H] ⁺	<u>iones y:</u> 1080,43→965,43→502,29→277,17 <u>iones b:</u> 962,52→661,41→255,12 <u>iones b-H₂O:</u> 237,29 <u>iones y-NH₃:</u> 1063,53; 949,45
				1472,29	[M+Na] ⁺	n/d
				1488,40	[M+K] ⁺	n/d
				1477,90	[M+H] ⁺	<u>iones y:</u> 1080,43→965,43→572,26→501,22
C16	254,42		1463,32	1464,32	[M+H] ⁺	<u>iones y:</u> 1080,43→965,43→502,29→277,17 <u>iones b:</u> 962,52→661,41→255,12 <u>iones b-H₂O:</u> 237,29 <u>iones y-NH₃:</u> 1063,53; 949,45
				1486,31	[M+Na] ⁺	n/d
				1502,43	[M+K] ⁺	n/d
				1477,90	[M+H] ⁺	<u>iones y:</u> 1080,43→965,43→572,26→501,22

FENGICINA A

FENGICINA B	C17	268,00	1476,90	<u>lones b:</u> 1364,79→1201,716→1073,65→976,7→905,56→675,48		
				<u>lones y-NH₃:</u> 949,45		
				1499,89	[M+Na] ⁺	n/d
	C12	198,31	1435,24	1436,24	[M+H] ⁺	n/d
				1458,23	[M+Na] ⁺	n/d
				1474,35	[M+K] ⁺	n/d
	C13	212,34	1449,27	1450,27	[M+H] ⁺	n/d
				1472,26	[M+Na] ⁺	n/d
	C14	226,21	1463,14	1488,37	[M+K] ⁺	n/d
				1464,14	[M+H] ⁺	n/d
	C15	240,39	1236,93	1477,33	[M+Na] ⁺	n/d
				1500,32	[M+Na] ⁺	n/d
	C16	254,42	1491,35	1516,43	[M+K] ⁺	n/d
				<u>lonesy:</u> 1236,89→1108,39→994→830,32→600,23→502,22→276,104		
				1492,35	[M+H] ⁺	<u>lones b:</u> 1378,72→1215,73→762,569
				<u>lones a:</u> 463,25		
	C17	268,00	1504,93	1514,34	[M+Na] ⁺	n/d
1530,46				[M+K] ⁺	n/d	
<u>lones y:</u> 1108,37→994→830,32→600,23						
C17	268,00	1504,93	1505,93	[M+H] ⁺	<u>lones b:</u> 675,55→398,48	
			<u>lones a:</u> 966,51			
			1527,92	[M+Na] ⁺	n/d	

Anexo III. Árbol filogenético de 31 cepas de *Bacillus* sp. evaluadas en este proyecto, empleando el gen 16S rRNA.



Anexo IV. Análisis de suelos empleados en el estudio

Suelo Tierra Negra (Alta concentración Materia Orgánica)

Identificación		Análisis de Suelos										Reporte No. 36369																			
Nombre: UNIVERSIDAD EAFIT Nit o C.C.: 890001389-5 Dirección: Telefono: 316 698 258 55 Fax: Email: nataliachoa@msn.com F. Recibo: 28-NOV-13		Municipio: Uraba (Antioquia) Vereda: Sin Especificar Finca: Tierra Negra Área: -Ha. Profundidad: -cms.					Cultivo actual: Cultivo anterior:																								
Código	Identificación en el campo	Textura				pH	C.E.	M.O.	Al	Ca	Mg	K	Na	CICE	P	S	Fe	Mn	Cu	Zn	B	N-NO3	N-NH4	N							
		A%	L%	Ar%	Clase																				dSm-1	%	cmolc kg-1	mg kg-1	%		
SP19343	Sustrato de Germinacion	76	22	2	AF	6.4	17.6	-	11.8	6.5	1.76	0.17	20.2	8	33	71	5	3	7	0.18											
Observaciones: SP19343*: Para la textura este material no dispersa --																															
Métodos: Textura: Bouyoucos; pH: Agua (1:1); Conductividad eléctrica: Extracto de saturación; Materia orgánica: Walkley Black; Al: KCl 1M; Ca, Mg, K, Na: Acetato de amonio 1M; CICE: Suma de cationes de cambio; S: Fosfato monocalcico 0.005M; Fe, Mn, Cu, Zn: Olsen - EDTA; B: Agua caliente; NO3: Sulfato de aluminio 0.025M; NH4: KCl 1M; P: Bray II.												Tener en cuenta: N.D. = No detectable N.A. = No aplica Para las unidades considere: dSm-1 = mmho cm-1 cmolc kg-1 = meq/100 g suelo ppm = mg kg-1										Revisión Agronómica									

Suelo de desierto (Baja concentración de materia orgánica).

Tomado de Bashan et al., 2000.

Chemical properties of soils from mesquite nurse-tree study site in Baja California, Mexico, comparing nutrient values from under canopy sites with barren areas outside canopy

Plot/site-type ^a	pH	P (mg/kg)	K (mg/kg)	Ca (cmol (p ⁺)/kg)	Mg (cmol (p ⁺)/kg)	Na (cmol (p ⁺)/kg)	CEC (cmol (p ⁺)/kg) ^b	EC (S/m) ^b	Fe (mg/kg)	Mn (mg/kg)	Cu (mg/kg)	Zn (mg/kg)	TC (g/kg) ^b	TN (g/kg) ^b	TIC (g/kg) ^b
1/UC	6.4	27	653	3.8	1.7	1.1	7.4	0.29	9.5	19.4	0.8	0.3	0.6	0.05	0.01
1/BA	6.6	18	507	2.7	1.5	0.6	5.4	0.21	18.4	6.4	1.0	0.4	0.3	0.02	0.01
2/UC	8.1	24	995	10.5	2.3	0.3	11.6	0.13	3.5	11.4	1.0	0.4	1.0	0.08	0.06
2/BA	8.9	8	745	11.2	1.9	0.3	11.2	0.01	2.2	3.1	0.7	0.2	0.4	0.02	0.05
3/UC	7.5	33	1279	9.6	2.6	0.3	13.0	0.18	6.7	15.0	0.6	0.5	1.2	0.09	0.04
3/BA	8.9	10	605	9.6	1.7	0.2	9.2	0.08	2.0	3.7	0.8	0.3	0.4	0.02	0.06
<i>Means</i>															
UC	7.3	28	976	8.0	2.2	0.6	10.7	0.20	6.6	15.3	0.8	0.4	0.9	0.07	0.4
BA	8.1	12	619	7.8	1.7	0.4	8.6	0.10	7.5	4.4	0.8	0.3	0.4	0.02	0.4
%	-	133	58	3	29	56	24	100	15	248	0	33	125	250	0
<i>Change^c</i>															

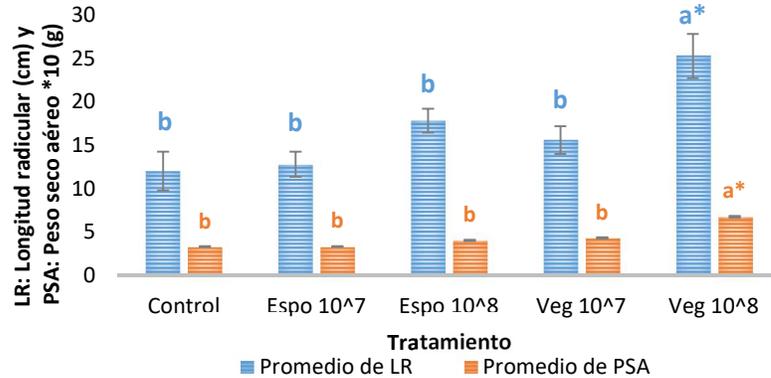
^a Mesquite tree under canopy (UC) plots (1-3) with averaged data from cactus species sites within each plot (as indicated in Fig. 1A-C); BA: barren area outside canopy.

^b CEC: cation exchange capacity; EC: soluble salts; TC: total carbon; TN: total nitrogen; TIC: total inorganic carbon.

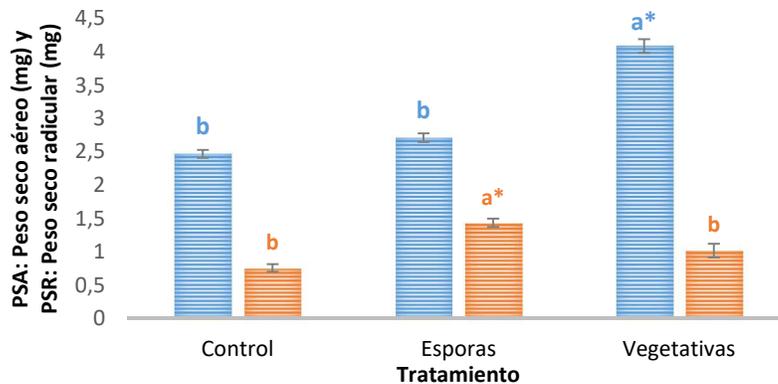
^c Indicates percent change in nutrient content (increase or decrease) between UC and BA site averages.

Anexo V. Evaluación de *B. subtilis* EA-CB0575 en plantas de tomate y banano.

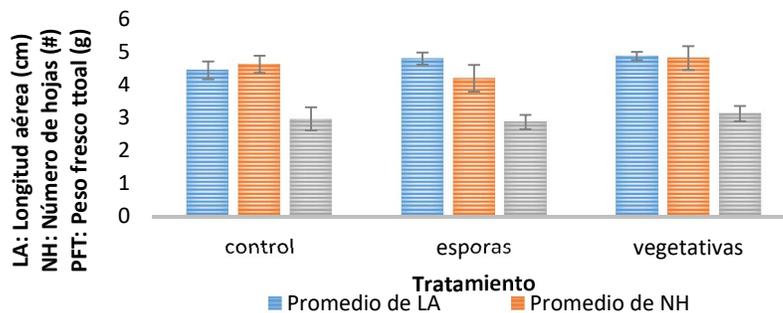
A. Efecto de diferentes concentraciones de esporas y células vegetativas de *B. subtilis* EA-CB0575 en el crecimiento de plantas de tomate en sustrato con alto contenido de materia orgánica después de 60 DDI



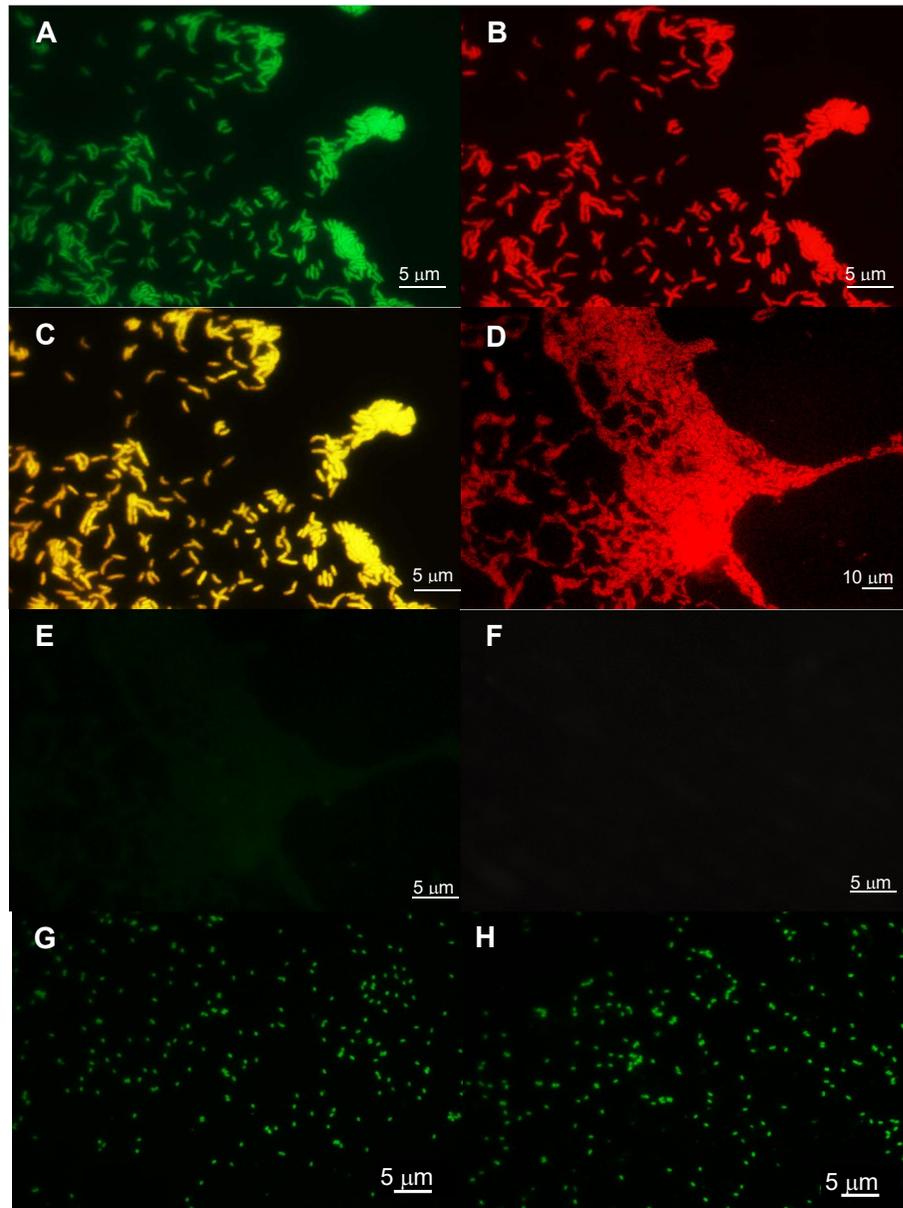
B. Efecto de diferentes concentraciones de esporas y células vegetativas de *B. subtilis* EA-CB0575 en el crecimiento de plantas de tomate en MS_(L) a los 30 DDI.



C. Efecto de la aplicación de esporas y células vegetativas de *B. subtilis* EA-CB0575 en el crecimiento de plantas de tomate en MS_(L) a los 30 DDI.



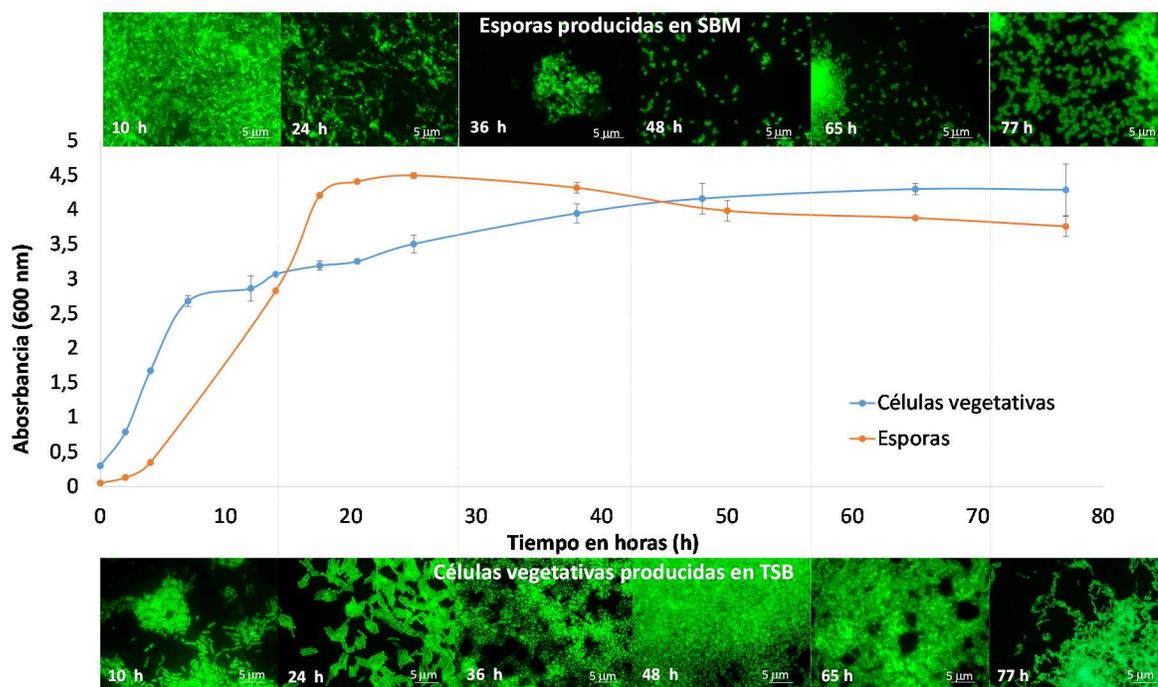
Anexo VI. FISH para células vegetativas y esporas de *B. subtilis* EA-CB0575 con la sonda /56-FAM/Bs575.



Hibridación de fluorescencia de *B. subtilis* EA-CB0575 con la sonda diseñada en sus diferentes versiones. **A.** Células vegetativas de *B. subtilis* EA-CB0575 hibridando con sonda /56-FAM/-Bs575 a las 24 h cultivo en medio TSB objetivo de 100X. **B.** Células vegetativas de *B. subtilis* EA-CB0575 hibridando con las mezcla de sondas EUBMIX 338, a las 24 hde cultivo en medio TSB en objetivo de 100X. **C.** Superposición de las imágenes A y B. **D.** Células vegetativas Células vegetativas de *B. subtilis* EA-CB0575 hibridando con la sonda Bs575-Cy3, a las 24 h de cultivo en medio TSB en objetivo de 40X. **E y F.** Células vegetativas del microorganismos de estudio sin adición de sonda, visualizadas en el filtro FITC y Cy3 respectivamente en objetivo de 100X. **G.** Cultivo de esporas en medio SBM sometidas a hibridación con las sondas Bs575-FAM y con la mezcla EUBMIX,

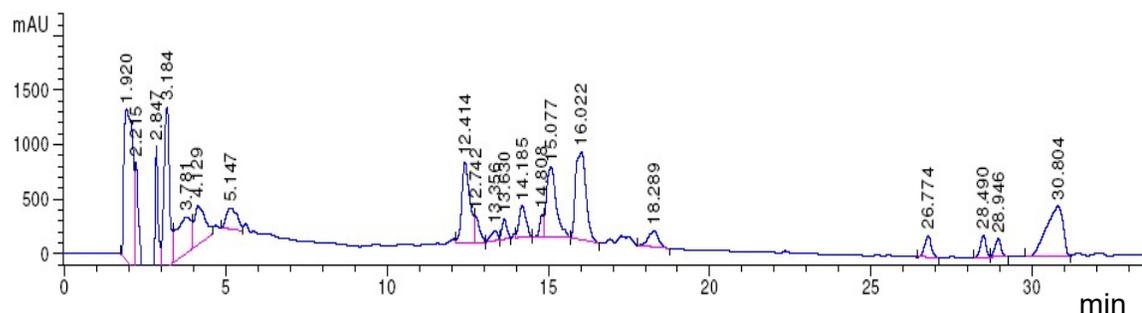
visualizadas en filtro FITC. H. Esporas a las que se les realizó todo el proceso de fijación, permeabilización, hibridación (sin sonda), lavado y finalmente visualización en FITC.

Anexo VII. Cinética de fluorescencia y detección de *B. subtilis* EA-CB0575 en medios TSB y SBM

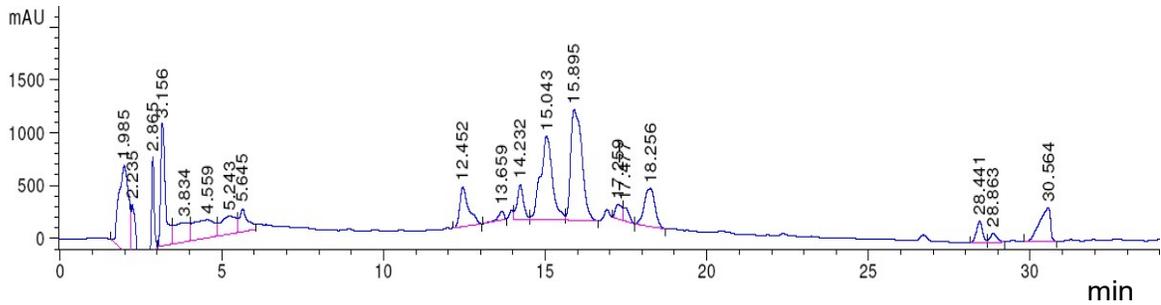


Anexo VIII. Perfiles cromatográficos de fracción SPE 100% Metanol de *B. subtilis* EA-CB0575 cultivado en medio TSB y SBM.

A. Cromatograma para el cultivo de *B. subtilis* EA-CB0575 en medio TSB.



B. Cromatograma para el cultivo de *B. subtilis* EA-CB0575 en medio SBM



Anexo IX. Iones precursores de surfactinas detectados en los extractos metanólicos de las muestras de raíces de banano inoculadas y sin inocular con *B. subtilis* EA-CB0575 y sembradas en MS_(s) y MS_(L)

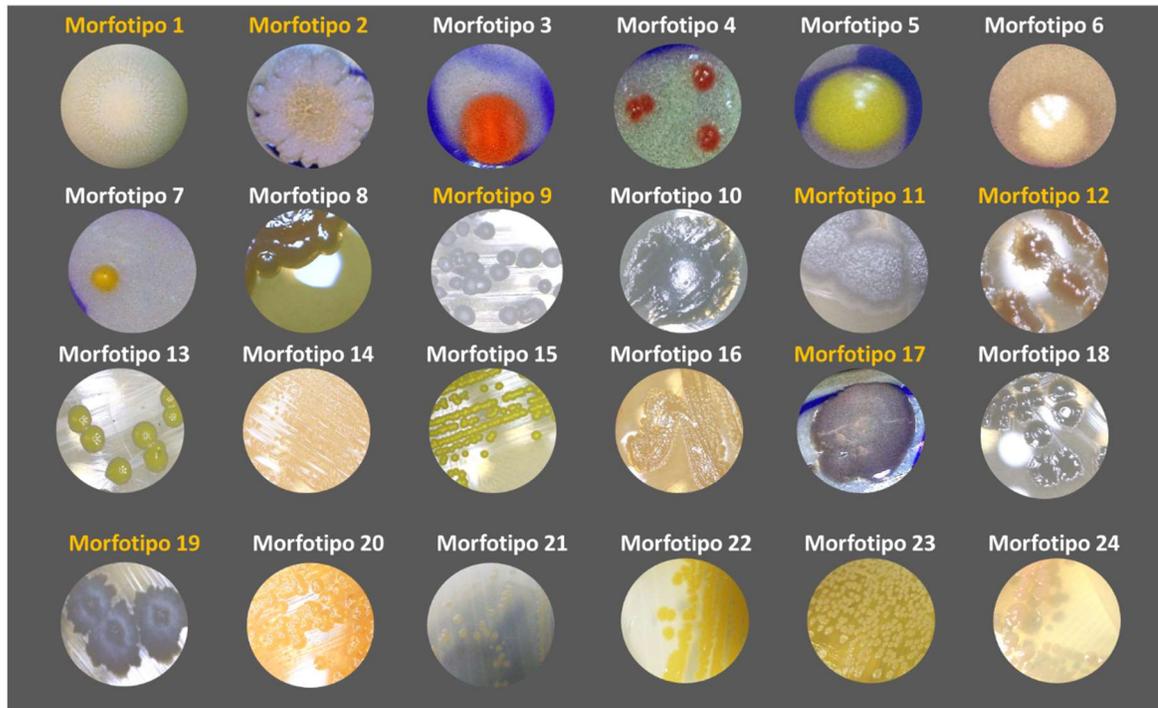
Medio	Tratamiento	Iones detectados	Intensidad normalizada	Iones detectados en MS/MS
MS _(s)	Control	1008,66	1,22*10 ⁶	iones y: 324,22 → 227,17 iones b: 895,58 → 685,45 → 360,28 iones b- H ₂ O: 568,40 → 554,35 → 455,31 → 342,23 iones inmonium: 86,10
		1022,67	4,82*10 ⁶	iones y: 667,42 → 554,35 → 441,27 → 342,28 → 227,17 iones b: 909,58 → 796,502 → 582,41 → 469,33 → 356,24 → 227,17 iones b(+/-H ₂ O): 245,18; 338,23 ion inmonium: 86,10
		1036,69	2,88*10 ⁶	iones y: 796,42 → 667,41 → 554,35 → 441,27 → 227,17 iones b: 923,61 → 810,52 → 695,50 → 596,43 → 483,34 → 370,26 iones b (-H ₂ O): 905,58 → 352,24 ion inmonium: 86,10
		1058,67	4,51*10 ⁵	iones y: 343,27 iones b: 945,59 iones b(-H ₂ O): 600,46
	Células Vegetativas	1008,66	3,53*10 ⁵	iones y: 667,46 → 441,27 → 227,17 iones b: 667,46 → 568,407 iones b(+/-H ₂ O): 360,21; 550,39 iones inmonium: 86,10
		1022,67	1,48*10 ⁶	iones y: 667,46 → 554,35 → 441,27 → 227,17 iones b: 909,58 → 582,41 → 469,33 → 227,17 iones b(-H ₂ O): 338,23

			<u>lones a:</u> 199,18
			<u>lones inmonium:</u> 86,10
	1036,67	1,52*10 ⁶	<u>lones y:</u> 667,46→554,35→441,27→227,17
			<u>lones b:</u> 923,51→695,50→596,43→483,34→370,26
			<u>lones b(-H₂O):</u> 792,51→352,25
			<u>lones inmonium:</u> 86,10
	1044,67	2,31*10 ⁶	<u>lones y:</u> 343,27
			<u>lones b:</u> 931,55
			<u>lones b-H₂O:</u> 231,07
	1058,67	1,15*10 ⁶	<u>lones y:</u> 343,12
			<u>lones b:</u> n/d
			<u>lones b(-H₂O):</u> 814,50→600,22
	1008,66	1,2*10 ⁶	<u>lones y:</u> n/d
			<u>lones b:</u> 895,58
			<u>lones b(-H₂O):</u> 455,32
	1022,67	3,8*10 ⁶	<u>lones y:</u> 667,46→554,35→441,27→227,17
			<u>lones b:</u> 909,58→582,41→469,33→356,24→ 227,17
			<u>lones b(+/-H₂O):</u> 245,18; 891,59→338,23
			<u>lones a:</u> 338,23→199,18
			<u>lones inmonium:</u> 86,10
	1036,67	3,78*10 ⁶	<u>lones y:</u> 667,46→554,35→441,27→227,17
			<u>lones b:</u> 923,51→695,50→596,43→483,34→370,26
			<u>lones b(-H₂O):</u> 905,57→352,24
			<u>lones inmonium:</u> 86,10
Esporas	1044,67	6,15*10 ⁵	<u>lones y:</u> n/d
			<u>lones b:</u> 931,57
			<u>lones b(-H₂O):</u> 800,48→360,36
	1050,71	7,23*10 ⁵	<u>lones y:</u> 554,35→441,27→227,17
			<u>lones b:</u> 937,61→610,43→497,36→384,27
			<u>lones b(-H₂O):</u> 366,27
			<u>lones inmonium:</u> 86,10
	1058,67	6,86*10 ⁵	<u>lones y:</u> 342,93
			<u>lones b:</u> 945,59
			<u>lones b- H₂O:</u> 599,73
	1072,69	4,84*10 ⁵	<u>lones y:</u> n/d
			<u>lones b:</u> 713,23
Control	1008,66	9,5*10 ⁶	<u>lones y:</u> 796,50 → 667,46 →554,35 → 441,27→ 227,17
			<u>lones b:</u> 895,58 →667,46→568,40→455,31→342,23

MS_(L)			<u>lonas b(-H₂O):</u> 568,40→554,35→455,31→342,23
			<u>lon inmonium:</u> 86,10
	1022,67	2,57*10 ⁷	<u>lonas y:</u> 796,5→667,41→554,35→441,27→227,17
			<u>lonas b:</u> 909,58→796,502→582,41→469,33→356,24→227,17
			<u>lonas b(+/-H₂O):</u> 245,18; 338,23
			<u>lonas a:</u> 328,19→119,18
			<u>lon inmonium:</u> 86,10
	1036,69	1,47*10 ⁷	<u>lonas y:</u> 667,41→554,35→441,27→227,17
			<u>lonas b:</u> 923,61→695,50→596,43→483,34→370,26
			<u>lonas b(-H₂O):</u> 352,24
			<u>lon inmonium:</u> 86,10
	1044,67	2,89*10 ⁶	<u>lonas y:</u> n/d
			<u>lonas b:</u> 931,57→818,49
			<u>lonas b(-H₂O):</u> 800,48
			<u>lonas a:</u> 463,25
1050,71	1*10 ⁶	<u>lonas y:</u> 441,27→342,20→227,17	
		<u>lonas b:</u> 497,36→384,27	
		<u>lonas b(+H₂O):</u> 515,08	
1058,67	1,9*10 ⁶	<u>lonas y:</u> n/d	
		<u>lonas b:</u> 945,59	
		<u>lonas b(-H₂O):</u> 814,50→599,82	
1072,69	5,52*10 ⁵	<u>lonas y:</u> n/d	
		<u>lonas b:</u> 406,79	
		<u>lonas b(+H₂O):</u> n/d	
1008,66	3,53*10 ⁵	<u>lonas y:</u> 667,46→554,35	
		<u>lonas b:</u> 895,58→782,49→667,46→455,31	
1022,67	1,48*10 ⁶	<u>lonas y:</u> 667,46→554,35→441,27→227,17	
		<u>lonas b:</u> 909,58→582,41→469,33→356,24→227,17	
		<u>lonas b(-H₂O):</u> 891,58→338,23	
		<u>lonas a:</u> 328,19→199,18	
		<u>lonas inmonium:</u> 86,10	
Vegetativas	1036,67	1,52*10 ⁶	<u>lonas y:</u> 667,46→554,35→441,27→227,17
			<u>lonas b:</u> 923,51→695,50→596,43→483,34→370,26
			<u>lonas inmonium:</u> 86,10
	1044,67	2,31*10 ⁶	<u>lonas y:</u>
			<u>lonas b:</u>
			<u>lonas b- H₂O:</u>
	1058,67	1,15*10 ⁶	<u>lonas y:</u> 441,27

			<u>lones b: n/d</u>
			<u>lones b(-H₂O): 663,47→618,47</u>
			<u>lones inmonium: 86,10</u>
	1008,66	3,44*10 ⁶	<u>lones y: 667,46→554,35→342,20→227,17</u>
			<u>lones b: 895,58→667,46→568,40→455,31→342,20</u>
			<u>lones b(+/-H₂O): 324,21; 685,45→245,17</u>
			<u>lones a: 1191,8</u>
			<u>lones inmonium: 86,10</u>
	1022,67	8,13*10 ⁶	<u>lones y: 667,46→554,35→441,27→227,17</u>
			<u>lones b: 909,58→582,41→469,33→356,24→227,17</u>
			<u>lones b(+/-H₂O): 245,18; 778,49→451,33→338,23</u>
			<u>lones a: 338,23→199,18</u>
			<u>lones inmonium: 86,10</u>
	1036,67	4,74*10 ⁶	<u>lones y: 667,46→554,35→441,27→227,17</u>
			<u>lones b: 923,51→695,50→596,43→483,34→370,26→227,17</u>
			<u>lones b(-H₂O): 905,57→352,24</u>
			<u>lones a: 199,18</u>
			<u>lones inmonium: 86,10</u>
Esporas	1044,67	2,88*10 ⁶	<u>lones y: 227,17</u>
			<u>lones b: 931,57</u>
			<u>lones b(-H₂O): 800,48</u>
	1050,71	6,19*10 ⁵	<u>lones y: 441,27→342,21→227,17</u>
			<u>lones b: 610,43→497,36</u>
			<u>lones b(-H₂O): 227,29</u>
			<u>lones inmonium: 86,10</u>
	1058,67	3,44*10 ⁶	<u>lones y: 342,93</u>
			<u>lones b: 945,59</u>
			<u>lones b(-H₂O): 814,50→600,14</u>
	1072,69	6,39*10 ⁵	<u>lones y: 441,22</u>
			<u>lones b: n/d</u>

Anexo X. Morfologías de endófitos aislados de raíces de banano *in vitro* en medio MS_(s)



*Las morfologías en amarillo corresponden a cepas identificadas como *Bacillus*.

Bibliografía

- Abderrahmani, A., Tapi, A., Nateche, F., Chollet, M., Leclère, V., Wathelet, B., Hacene, H., Jacques, P. 2011. Bioinformatics and molecular approaches to detect NRPS genes involved in the biosynthesis of kurstakin from *Bacillus thuringiensis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92(3), 571-581.
- Adesemoye, A.O., Obini, M., Ugoji, E.O. 2008. Comparison of plant growth-promotion with *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis* in three vegetables. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(3), 423-426.
- Aleti, G., Lehner, S., Bacher, M., Compant, S., Nikolic, B., Plesko, M., Schuhmacher, R., Sessitsch, A., Brader, G. 2016. Surfactin variants mediate species-specific biofilm formation and root colonization in *Bacillus*. *Environmental Microbiology*, 18(8), 2634-2645.
- Aleti, G., Sessitsch, A., Brader, G. 2015. Genome mining: Prediction of lipopeptides and polyketides from *Bacillus* and related Firmicutes. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 13, 192-203.
- Allard-Massicotte, R., Tessier, L., Lécuyer, F., Lakshmanan, V., Lucier, J., Garneau, D., Caudwell, L., Vlamakis, H., Bais, H., Beaugregard, P.B., 2016. *Bacillus subtilis* early colonization of *Arabidopsis thaliana* roots involves multiple chemotaxis receptors. *mBio* 7(6):e01664-16. doi:10.1128/mBio.01664-16.
- Alm, E.W., Oerther, D.B., Larsen, N., Stahl, D.A., Raskin, L., 1996. The oligonucleotide probe database. *Applied and Environmental Microbiology*. 62(10), 3557-3559.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 215(3), 403-10.
- Andrews, S. 2010. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.
- Ansorge, W.J. 2016. Next generation DNA Sequencing (II): Techniques and Applications. *Next Generat Sequenc & Applic* S1(005).
- Asaka, O., Shoda, M. 1996. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* Damping-Off of Tomato with *Bacillus subtilis* RB14. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(11), 4081-4085.
- Aslantaş, R., Çakmakçı, R., Şahin, F. 2007. Effect of plant growth promoting rhizobacteria on young apple tree growth and fruit yield under orchard conditions. *Scientia Horticulturae*, 111(4), 371-377.
- Atlas, Ronald. 2010. Handbook of microbiological media. CRC Press. Cuarta Edición. 2040 páginas.
- AUGURA. 2016. Coyuntura Bananera 2015. Asociación de Bananeros de Colombia.
- Aziz, R.K., Bartels, D., Best, A.A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R.A., Formsma, K., Gerdes, S., Glass, E.M., Kubal, M., Meyer, F., Olsen, G.J., Olson, R., Osterman, A.L., Overbeek, R.A., McNeil, L.K., Paarmann, D., Paczian, T., Parrello, B., Pusch, G.D., Reich, C., Stevens, R., Vassieva, O., Vonstein, V., Wilke, A., Zagnitko, O. 2008. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics*, 9, 75.

- Aznar, A., Dellagi, A. 2015. New insights into the role of siderophores as triggers of plant immunity: what can we learn from animals? *Journal of Experimental Botany*.
- Babic, K.H., Schauss, K., Hai, B., Sikora, S., Redzepovic, S., Radl, V., Schloter, M. 2008. Influence of different *Sinorhizobium meliloti* inocula on abundance of genes involved in nitrogen transformations in the rhizosphere of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Environ Microbiol*, 10(11), 2922-30.
- Bacilio, M., Rodriguez, H., Moreno, M., Hernandez, J.P., Bashan, Y. 2004. Mitigation of salt stress in wheat seedlings by a *gfp*-tagged *Azospirillum lipoferum*. *Biology and Fertility of Soils*, 40(3), 188-193.
- Bai, Y., Pan, B., Charles, T.C., Smith, D.L. 2002. Co-inoculation dose and root zone temperature for plant growth promoting rhizobacteria on soybean [*Glycine max* (L.) Merr] grown in soil-less media. *Soil Biology and Biochemistry*, 34(12), 1953-1957.
- Bais, H.P., Fall, R., Vivanco, J.M. 2004. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant Physiology*, 134(1), 307-319.
- Bais, H.P., Weir, T.L., Perry, L.G., Gilroy, S., Vivanco, J.M. 2006. The Role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology*, 57(1), 233-266.
- Baldan, E., Nigris, S., Romualdi, C., D'Alessandro, S., Clocchiatti, A., Zottini, M., Stevanato, P., Squartini, A., Baldan, B. 2015. Beneficial Bacteria Isolated from Grapevine Inner Tissues Shape *Arabidopsis thaliana* Roots. *PLOS ONE*, 10(10), e0140252.
- Barazani, O., Friedman, J. 1999. Is IAA the Major Root Growth Factor Secreted from Plant-Growth-Mediating Bacteria? *Journal of Chemical Ecology*, 25(10), 2397-2406.
- Barea, J.M., Pozo, M.J., Azcon, R., Azcon-Aguilar, C. 2005. Microbial co-operation in the rhizosphere. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology*, 141(3).
- Bashan, Y. 1998. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology Advances*, 16(4), 729-770.
- Bazinet, A.L., Zwickl, D.J., Cummings, M.P. 2014. A gateway for phylogenetic analysis powered by grid computing featuring GARLI 2.0. *Syst Biol*, 63(5), 812-8.
- Beauregard, P.B. 2015. Chapter One - Not Just Sweet Talkers: How Roots Stimulate Their Colonization by Beneficial Bacteria. in: *Advances in Botanical Research*, (Ed.) S. Harsh Bais and Janine, Vol. Volume 75, Academic Press, pp. 1-20.
- Beauregard, P.B., Chai, Y.R., Vlamakis, H., Losick, R., Kolter, R. 2013. *Bacillus subtilis* biofilm induction by plant polysaccharides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(17), E1621-E1630.
- Bechet, M., Caradec, T., Hussein, W., Abderrahmani, A., Chollet, M., Leclere, V., Dubois, T., Lereclus, D., Pupin, M., Jacques, P. 2012. Structure, biosynthesis, and properties of kurstakins, nonribosomal lipopeptides from *Bacillus* spp. *Appl Microbiol Biotechnol*, 95(3), 593-600.
- Beneduzi, A., Ambrosini, A., Passaglia, L.M.P. 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetics and Molecular Biology*, 35(4 Suppl), 1044-1051.
- Benizri, E., Schoeny, A., Picard, C., Courtade, A., Guckert, A. 1997. External and Internal Root Colonization of Maize by Two *Pseudomonas* Strains: Enumeration by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Current Microbiology*, 34(5), 297-302.
- Berg, G. 2009. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84(1), 11-18.

- Berg, G., Zachow, C. 2011. PGPR Interplay with Rhizosphere Communities and Effect on Plant Growth and Health. in: *Bacteria in Agrobiolgy: Crop Ecosystems*, (Ed.) D.K. Maheshwari, Springer Berlin Heidelberg. Berlin, Heidelberg, pp. 97-109.
- Bergottini, V.M., Otegui, M.B., Sosa, D.A., Zapata, P.D., Mulot, M., Rebord, M., Zopfi, J., Wiss, F., Benrey, B., Junier, P. 2015. Bio-inoculation of yerba mate seedlings (*Ilex paraguariensis* St. Hill.) with native plant growth-promoting rhizobacteria: a sustainable alternative to improve crop yield. *Biology and Fertility of Soils*, 51(6), 749-755.
- Besson, F., Peypoux, F., Michel, G., Delcambe, L. 1976. Characterization of iturin A in antibiotics from various strains of *Bacillus subtilis*. *J Antibiot (Tokyo)*, 29(10), 1043-9.
- Bhattacharyya, P., Jha, D. 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1327-1350.
- Bloom-Ackermann, Z., Ganin, H., Kolodkin-Gal, I. 2016. Quorum-sensing Cascades Governing Bacterial Multicellular Communities. *Israel Journal of Chemistry*, 56(5), 302-309.
- Bolger, A.M., Lohse, M., Usadel, B. 2014. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics*, btu, 170.
- Bóka, B., Manczinger, L., Kecskeméti, A., Chandrasekaran, M., Kadaikunnan, S., Alharbi, N.S., Vágvölgyi, C., Szekeres, A. 2016. Ion trap mass spectrometry of surfactins produced by *Bacillus subtilis* SZMC 6179J reveals novel fragmentation features of cyclic lipopeptides. 30(13), 1581-1590.
- Borriss, R. 2011. Use of Plant-Associated *Bacillus* Strains as Biofertilizers and Biocontrol Agents in Agriculture. in: *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Growth Responses*, Springer Berlin Heidelberg. Berlin, Heidelberg, pp. 41-76.
- Branda, S.S., Chu, F., Kearns, D.B., Losick, R., Kolter, R. 2006. A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix. *Molecular Microbiology*, 59(4), 1229-1238.
- Branda, S.S., González-Pastor, J.E., Ben-Yehuda, S., Losick, R., Kolter, R. 2001. Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(20), 11621-11626.
- Brown, C.T., Fishwick, L.K., Chokshi, B.M., Cuff, M.A., Jackson, J.M.t., Oglesby, T., Rioux, A.T., Rodriguez, E., Stupp, G.S., Trupp, A.H., Woolcombe-Clarke, J.S., Wright, T.N., Zaragoza, W.J., Drew, J.C., Triplett, E.W., Nicholson, W.L. 2011. Whole-genome sequencing and phenotypic analysis of *Bacillus subtilis* mutants following evolution under conditions of relaxed selection for sporulation. *Appl Environ Microbiol*, 77(19), 6867-77.
- Buddrus-Schiemann, K., Schmid, M., Schreiner, K., Welzl, G., Hartmann, A. 2010. Root Colonization by *Pseudomonas* sp DSMZ 13134 and Impact on the Indigenous Rhizosphere Bacterial Community of Barley. *Microbial Ecology*, 60(2), 381-393.
- Budiharjo, A., Chowdhury, SP., Dietel, K., Beator, B., Dolgova, O., et al. (2014) Transposon Mutagenesis of the Plant-Associated *Bacillus amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* FZB42 Revealed That the *nfrA* and *RBAM17410* Genes Are Involved in Plant-Microbe-Interactions. *PLOS ONE* 9(5) e98267. doi: 10.1371/journal.pone.0098267
- Bulgarelli, D., Schlaeppi, K., Spaepen, S., Ver Loren van Themaat, E., Schulze-Lefert, P. 2013. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annu Rev Plant Biol*, 64, 807-38.
- Burkholder, P.R., Giles, N.H. 1947. Induced Biochemical Mutations in *Bacillus subtilis*. 34(6), 345-348.
- Calvo, P., Nelson, L., Kloepper, J. 2014. Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant and Soil*, 383(1-2), 3-41.
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., Madden, T.L. 2009. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics*, 10, 421.

- Cao, D.-d., Hu, J., Huang, X.-x., Wang, X.-j., Guan, Y.-j., Wang, Z.-f. 2008. Relationships between changes of kernel nutritive components and seed vigor during development stages of F(1) seeds of sh (2) sweet corn. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 9(12), 964-968.
- Cardinale, M. 2014. Scanning a microhabitat: plant-microbe interactions revealed by confocal laser microscopy. *Front Microbiol*, 5, 94.
- Castro-Sowinski, S., Herschkovitz, Y., Okon, Y., Jurkevitch, E. 2007. Effects of inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria on resident rhizosphere microorganisms. *Fems Microbiology Letters*, 276(1), 1-11.
- Ceballos, I., Mosquera, S., Angulo, M., Mira, J., Argel, L.E., Uribe-Vélez, D., Romero-Tabarez, M., Orduz-peralta, S., Villegas-Escobar, V. 2012. Cultivable Bacteria Populations Associated with Leaves of Banana and Plantain Plants and Their Antagonistic Activity Against *Mycosphaerella fijiensis*. *Microbial Ecology* 64, 641-653.
- Chaabouni, I., Guesmi, A., Cherif, A. 2012. Secondary Metabolites of *Bacillus*: Potentials in Biotechnology. in: *Bacillus thuringiensis Biotechnology*, (Ed.) E. Sansinenea, Springer Netherlands. Dordrecht, pp. 347-366.
- Chambers, M.C., Maclean, B., Burke, R., Amodei, D., Ruderman, D.L., Neumann, S., Gatto, L., Fischer, B., Pratt, B., Egertson, J., Hoff, K., Kessner, D., Tasman, N., Shulman, N., Frewen, B., Baker, T.A., Brusniak, M.-Y., Paulse, C., Creasy, D., Flashner, L., Kani, K., Moulding, C., Seymour, S.L., Nuwaysir, L.M., Lefebvre, B., Kuhlmann, F., Roark, J., Rainer, P., Detlev, S., Hemenway, T., Huhmer, A., Langridge, J., Connolly, B., Chadick, T., Holly, K., Eckels, J., Deutsch, E.W., Moritz, R.L., Katz, J.E., Agus, D.B., MacCoss, M., Tabb, D.L., Mallick, P. 2012. A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics. *Nat Biotech*, 30(10), 918-920.
- Chandler, S., Van Hese, N., Coutte, F., Jacques, P., Höfte, M., De Vleeschauwer, D. 2015. Role of cyclic lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* in mounting induced immunity in rice (*Oryza sativa* L.). *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 91, 20-30.
- Chandra, S., Bandopadhyay, R., Kumar, V., Chandra, R. 2010. Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. *Biotechnology Letters*, 32(9), 1199-1205.
- Chen, C., Bai, Y.H., Liang, J.S., Yuan, L.J. 2015. [Application of FISH-NanoSIMS technique in environmental microbial ecology study]. *Huan Jing Ke Xue*, 36(1), 244-51.
- Chen, L., Liu, Y., Wu, G., Veronican Njeri, K., Shen, Q., Zhang, N., Zhang, R. 2016. Induced maize salt tolerance by rhizosphere inoculation of *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9. *Physiologia Plantarum*, 158(1), 34-44.
- Chen, X., Koumoutsis, A., Scholz, R., Eisenreich, A., Schneider, K., Heinemeyer, I., Morgenstern, B., Voss, B., Hess, W., Reva, O., Junge, H., Voigt, B., Jungblut, P., Vater, J., Sussmuth, R., Liesegang, H., Strittmatter, A., Gottschalk, G., Borriss, R. 2007. Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Nat Biotechnol*, 25.
- Chen, Y., Yan, F., Chai, Y., Liu, H., Kolter, R., Losick, R., Guo, J.H. 2013. Biocontrol of tomato wilt disease by *Bacillus subtilis* isolates from natural environments depends on conserved genes mediating biofilm formation. *Environ Microbiol*, 15(3), 848-64.
- Chen, Z.M., Li, Q., Liu, H.M., Yu, N., Xie, T.J., Yang, M.Y., Shen, P., Chen, X.D. 2010. Greater enhancement of *Bacillus subtilis* spore yields in submerged cultures by optimization of medium composition through statistical experimental designs. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(5), 1353-1360.
- Chevreaux, B. 2007. MIRA: an automated genome and EST assembler.
- ChinAwoeng, T.F.C., dePriester, W., vanderBij, A.J., Lugtenberg, B.J.J. 1997. Description of the colonization of a gnotobiotic tomato rhizosphere by *Pseudomonas fluorescens*

- biocontrol strain WCS365, using scanning electron microscopy. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 10(1).
- Chojnacka, K. 2015. Innovative bio-products for agriculture. *Open Chemistry*, 13(1), 932-937.
- Choudhary, D.K., Johri, B.N. 2009. Interactions of *Bacillus* spp. and plants - With special reference to induced systemic resistance (ISR). *Microbiological Research*, 164(5), 493-513.
- Chowdhury, S.P., Dietel, K., Randler, M., Schmid, M., Junge, H., Borriss, R., Hartmann, A., Grosch, R. 2013. Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 on lettuce growth and health under pathogen pressure and its impact on the rhizosphere bacterial community. *PLoS one*, 8(7), e68818-e68818.
- Chowdhury, S.P., Hartmann, A., Gao, X., Borriss, R. 2015. Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 – a review. *Frontiers in Microbiology*, 6, 780.
- Compant, S., Clément, C., Sessitsch, A. 2010. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biol Biochem*, 42.
- Compeau, P.E.C., Pevzner, P.A., Tesler, G. 2011. How to apply de Bruijn graphs to genome assembly. *Nat Biotech*, 29(11), 987-991.
- Cuellar, T., Posada U., L.F. 2013. Ensayos de promoción de crecimiento en crisantemo con *Bacillus subtilis* EA-CB0575, Universidad EAFIT Medellín. Medellín.
- Daims, H., Bruhl A Fau - Amann, R., Amann R Fau - Schleifer, K.H., Schleifer Kh Fau - Wagner, M., Wagner, M. 1999. The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Syst Appl Microbiol*, 22(3)), 334-344.
- Daims, H., Lucker, S., Wagner, M. 2006. daime, a novel image analysis program for microbial ecology and biofilm research. *Environ Microbiol*, 8(2), 200-13.
- Daly, K., Shirazi-Beechey, S.P. 2003. Design and evaluation of group-specific oligonucleotide probes for quantitative analysis of intestinal ecosystems: their application to assessment of equine colonic microflora. *FEMS Microbiol Ecol*, 44(2), 243-52.
- Darling, A.E., Mau, B., Perna, N.T. 2010. progressiveMauve: multiple genome alignment with gene gain, loss and rearrangement. *PLoS One*, 5(6), e11147.
- Dazzo, F., Yanni, Y., Jones, A., Elsadany, A. 2015. CMEIAS: bioimage informatics that define the landscape ecology of immature microbial biofilms developed on plant rhizoplanes surfaces. *AIMS Bioengineering*, 2(4).
- de Muro, M.A. 2005. Probe Design, Production, and Applications. in: *Medical Biomethods Handbook*, (Eds.) J.M. Walker, R. Rapley, Humana Press. Totowa, NJ, pp. 13-23.
- de-Bashan, L.E., Hernandez, J.-P., Bashan, Y., Maier, R.M. 2010. *Bacillus pumilus* ES4: Candidate plant growth-promoting bacterium to enhance establishment of plants in mine tailings. *Environmental and Experimental Botany*, 69(3), 343-352.
- Del Avila, A., Pereyra, S.M., Argüello, J.A. 1996. Potato micropropagation: Growth of cultivars in solid and liquid media. *Potato Research*, 39(2), 253-258.
- Delseny, M., Han, B., Hsing, Y.I. 2010. High throughput DNA sequencing: The new sequencing revolution. *Plant Science*, 179(5), 407-422.
- Demaneche, S., Sanguin, H., Pote, J., Navarro, E., Bernillon, D., Mavingui, P., Wildi, W., Vogel, T.M., Simonet, P. 2008. Antibiotic-resistant soil bacteria in transgenic plant fields. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(10), 3957-62.
- Deravel, J., Krier, F., Jacques, P. 2014. Biopesticides, a complementary and alternative approach to the use of agrochemicals. *Biotechnologie Agronomie Societe Et Environnement*, 18(2), 220-232.

- Dervaux, J., Magniez, J.C., Libchaber, A. 2014. On growth and form of *Bacillus subtilis* biofilm. *Interface Focus*, 4(6).
- Dietel, K., Beator, B., Budiharjo, A., Fan, B., Borriss, R. 2013. Bacterial Traits Involved in Colonization of *Arabidopsis thaliana* Roots by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *The Plant Pathology Journal*, 29(1), 59-66.
- Dinesh, R., Anandaraj, M., Kumar, A., Bini, Y.K., Subila, K.P., Aravind, R. 2015. Isolation, characterization, and evaluation of multi-trait plant growth promoting rhizobacteria for their growth promoting and disease suppressing effects on ginger. *Microbiological Research*, 173, 34-43.
- Dogsa, I., Oslizlo, A., Stefanic, P., Mandic-Mulec, I. 2014. Social interactions and biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *Food Technology and Biotechnology*, 52(2), 149.
- Domenech, J., Ramos-Solano, B., Probanza, A., Lucas-García, J.A., Colón, J.J., Gutiérrez-Mañero, F.J. 2004. *Bacillus* spp. and *Pisolithus tinctorius* effects on *Quercus ilex* ssp. ballota: a study on tree growth, rhizosphere community structure and mycorrhizal infection. *Forest Ecology and Management*, 194(1-3), 293-303.
- Earl, A., Losick, R., Kolter, R. 2008. Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends Microbiol*, 16.
- Eckert, B., Weber, O.B., Kirchhof, G., Halbritter, A., Stoffels, M., Hartmann, A. 2001. *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 51(Pt 1), 17-26.
- Egamberdieva, D., Jabborova, D., Hashem, A., 2015. *Pseudomonas* induces salinity tolerance in cotton (*Gossypium hirsutum*) and resistance to *Fusarium* root rot through the modulation of indole-3-acetic acid, *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22 (6), 773-779.
- Eickhorst, T., Tippkötter, R. 2008. Improved detection of soil microorganisms using fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and catalyzed reporter deposition (CARD-FISH). *Soil Biology and Biochemistry*, 40(7), 1883-1891.
- El-Howeity, M.A., Asfour, M.M. 2012. Response of some varieties of canola plant (*Brassica napus* L.) cultivated in a newly reclaimed desert to plant growth promoting rhizobacteria and mineral nitrogen fertilizer. *Annals of Agricultural Sciences*, 57(2), 129-136.
- Errington, J. 2003. Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nature Reviews Microbiology*, 1(2), 117-126.
- Eskew, D.F., Focht, D.D., Ting, I.P. 1977. Nitrogen fixation, denitrification, and pleomorphic growth in a highly pigmented *Spirillum lipoferum*. *Appl Environ Microbiol*, 4(5), 582-585.
- Fan, B., Borriss, R., Bleiss, W., Wu, X. 2012a. Gram-positive Rhizobacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 Colonizes Three Types of Plants in Different Patterns. *Journal of Microbiology*, 50(1), 38-44.
- Fan, B., Chen, X.H., Chen Xh, F., Budiharjo, A., Budiharjo, A.F., Bleiss, W., Bleiss, W.F., Vater, J., Fau, V.J., Borriss, R. 2012b. Efficient colonization of plant roots by the plant growth promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42, engineered to express green fluorescent protein. *Journal of Biotechnology*, 151(1873-4863 (Electronic)), 303-311.
- FAO. 2011. Banana statistics 2011.
- FAO. 2009. How to feed the world 2050.
- Felici, C., Vettori, L., Giraldi, E., Forino, L.M.C., Toffanin, A., Tagliasacchi, A.M., Nuti, M. 2008. Single and co-inoculation of *Bacillus subtilis* and *Azospirillum brasilense* on *Lycopersicon esculentum*: Effects on plant growth and rhizosphere microbial community. *Applied Soil Ecology*, 40(2), 260-270.
- Felske, A.D.M., Heyrman, J., Balcaen, A., de Vos, P. 2003. Multiplex PCR screening of soil isolates for novel *Bacillus*-related lineages. *Journal of Microbiological Methods*, 55(2), 447-458.

- Figueroa-López, A.M., Cordero-Ramírez, J.D., Martínez-Álvarez, J.C., López-Meyer, M., Lizárraga-Sánchez, G.J., Félix-Gastélum, R., Castro-Martínez, C., Maldonado-Mendoza, I.E. 2016. Rhizospheric bacteria of maize with potential for biocontrol of *Fusarium verticillioides*. *SpringerPlus*, 5, 330.
- FINAGRO. 2014. El cultivo de tomate en Colombia.
- Franco Sierra, N., Santa-María Restrepo, G. 2015. Ensamble y caracterización genómica de cepas de *Bacillus subtilis* aisladas de *Musa* AAA con miras al mejoramiento biotecnológico de bioinoculantes. in: Departamento de Ingeniería de Procesos, Vol. Ingeniero de Procesos, Universidad EAFIT. Medellín, Colombia, pp. 93.
- Frey, A., Feldman, D., Trefely, S., Worth, A., Basu, S., Snyder, N., 2016, LC-quadrupole/Orbitrap high-resolution mass spectrometry enables stable isotope-resolved simultaneous quantification and ¹³C-isotopic labeling of acyl-coenzyme A thioesters. *Anal Bioanal Chem* (408), 3651-3658.
- Fritze, D. 2004. Taxonomy of the Genus *Bacillus* and Related Genera: The Aerobic Endospore-Forming Bacteria. *Phytopathology*, 94(11), 1245-1248.
- Gaiero, J.R., McCall, C.A., Thompson, K.A., Day, N.J., Best, A.S., Dunfield, K.E. 2013. Inside the root microbiome: Bacterial root endophytes and plant growth promotion. *American Journal of Botany*, 100(9), 1738-1750.
- Gao, F., Zhang, C.-T. 2008. Ori-Finder: A web-based system for finding oriC s in unannotated bacterial genomes. *BMC Bioinformatics*, 9(1), 1-6.
- Gao, S., Wu, H., Yu, X., Qian, L., Gao, X. 2016. Swarming motility plays the major role in migration during tomato root colonization by *Bacillus subtilis* SWR01. *Biological Control*, 98, 11-17.
- Ghelardi, E., Salvetti, S., Ceragioli, M., Gueye, S.A., Celandroni, F., Senesi, S. 2012. Contribution of surfactin and SwrA to flagellin expression, swimming, and surface motility in *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol*, 78(18), 6540-4.
- Ghosh, S., Setlow, P. 2010. The preparation, germination properties and stability of superdormant spores of *Bacillus cereus*. *J Appl Microbiol*, 108(2), 582-90.
- Gilbert, D. 2003. Sequence file format conversion with command-line readseq. *Curr Protoc Bioinformatics*, Appendix 1, Appendix 1E.
- Glick, B.R. 2012. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*, 2012.
- Govindasamy, V., Senthilkumar, M., Annapurna, K. 2015. Effect of mustard rhizobacteria on wheat growth promotion under cadmium stress: characterization of *acdS* gene coding ACC deaminase. *Annals of Microbiology*, 65(3), 1679-1687.
- Grobelak, A., Napora, A., Kacprzak, M. 2015. Using plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) to improve plant growth. *Ecological Engineering*, 84, 22-28.
- Guerrero, R., Margulis, L., Berlanga, M. 2013. Symbiogenesis: the holobiont as a unit of evolution. *Int Microbiol*, 16(3), 133-43.
- Guo, S., Li, X., He, P., Ho, H., Wu, Y., He, Y. 2015. Whole-genome sequencing of *Bacillus subtilis* XF-1 reveals mechanisms for biological control and multiple beneficial properties in plants. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 42(6), 925-937.
- Gupta, A., Gopal M., Thomas, G., Manikandan V., Gajewski, J., 2014. Whole Genome Sequencing and analysis of Plant Growth Promoting Bacteria isolated from the rhizosphere of plantation crops coconut, cocoa and arecanut. *Plos One* 9(8). e104259. doi:10.1371/journal.pone.0104259
- Haas, D., Defago, G. 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology*, 3(4), 307-319.

- Haichar, F.E., Marol, C., Berge, O., Rangel-Castro, J.I., Prosser, J.I., Balesdent, J., Heulin, T., Achouak, W. 2008. Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. *ISME J*, 2.
- Hallmann, J., Berg, G. 2006. Spectrum and Population Dynamics of Bacterial Root Endophytes. in: *Microbial Root Endophytes*, (Eds.) B.J.E. Schulz, C.J.C. Boyle, T.N. Sieber, Springer Berlin Heidelberg. Berlin, Heidelberg, pp. 15-31.
- Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W.F., Kloeppe, J.W. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*, 43(10), 895-914.
- Hardwood, C. 1989. Introduction of the biotechnology of *Bacillus*. in: *Bacillus* (Ed.) C. Hardwood, Plenum Press. New York, pp. 412.
- Hassen, A.I., Labuschagne, N. 2010. Root colonization and growth enhancement in wheat and tomato by rhizobacteria isolated from the rhizoplane of grasses. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 26(10), 1837-1846.
- Heslop-Harrison, J.S., Schwarzacher, T. 2007. Domestication, Genomics and the Future for Banana. *Annals of Botany*, 100(5), 1073-1084.
- Holguin, G., Bashan, Y. 1996. Nitrogen-fixation by *Azospirillum brasilense* CD is promoted when co-cultured with a mangrove rhizosphere bacterium (*Staphylococcus* sp.). *Soil Biol. Chemistry*, 28(12), 1651-1660.
- Huang, X.-F., Chaparro, J.M., Reardon, K.F., Zhang, R., Shen, Q., Vivanco, J.M. 2014. Rhizosphere interactions: root exudates, microbes, and microbial communities. *Botany*, 92(4), 267-275.
- Huang, X.F., Zhou, D., Guo, J., Manter, D.K., Reardon, K.F., Vivanco, J.M. 2015. *Bacillus* spp. from rainforest soil promote plant growth under limited nitrogen conditions. *Journal of Applied Microbiology*, 118(3), 672-684.
- Hue, N., Serani, L., Laprévotte, O. 2001. Structural investigation of cyclic peptidolipids from *Bacillus subtilis* by high-energy tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 15(3), 203-209.
- Hugenholtz, P., Tyson, G.W., Blackall, L.L. 2002. Design and Evaluation of 16S rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes for Fluorescence *In Situ* Hybridization. in: *Gene Probes: Principles and Protocols*, (Ed.) B.A. Lieberman, Vol. 176, Humana Press. Totowa, NJ, pp. 29-42.
- Hussien, F., Osman, M., Idris, T.I.M. 2014. The Influence of Liquid Media Support, Gelling Agents and Liquid overlays on performance of *in vitro* Cultures of Ginger (*Zingiber officinale*). *International Journal of Scientific and Research Publications*, 4(10), 1-5.
- Idriss, E.E., Makarewicz, O.M., Farouk, A., Rosner, K., Greiner, R., Bochow, H., Richter, T., Borriss, R. 2002. Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect. *Microbiology*, 148.
- Islam, S., Akanda, A.M., Prova, A., Islam, M.T., Hossain, M.M. 2015. Isolation and Identification of Plant Growth Promoting Rhizobacteria from Cucumber Rhizosphere and Their Effect on Plant Growth Promotion and Disease Suppression. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1360.
- Itaya, M., Matsui, K. 1999. Conversion of *Bacillus subtilis* 168: Natto producing *Bacillus subtilis* with mosaic genomes. *Biosci Biotechnol Biochem*, 63.
- Ivanova, N., Sorokin, A., Anderson, I., Galleron, N., Candelon, B., Kapatral, V., Bhattacharyya, A., Reznik, G., Mikhailova, N., Lapidus, A., Chu, L., Mazur, M., Goltsman, E., Larsen, N., D'Souza, M., Walunas, T., Grechkin, Y., Pusch, G., Haselkorn, R., Fonstein, M., Dusko Ehrlich, S., Overbeek, R., Kyrpides, N. 2003. Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis*. *Nature*, 423(6935), 87-91.

- Jacques, P., Hbid, C., Destain, J., Razafindralambo, H., Paquot, M., De Pawn, E., Thonart, P. 1999. Optimization of Biosurfactant Lipopeptide production from *Bacillus subtilis* S499 by Plackett-Burman Design. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 77-79, 223-233.
- Jaizme Vega, M., Rodriguez, A., Piñero, M. 2004. Potencial use of rhizobacteria from the *Bacillus* genus to stimulate the plant growth of micropropagate banana. *Fruits*, 59(2), 83-90.
- Jaramillo, J., Rodríguez, V.P., Guzmán, M., Zapata, M., Renfigo, T. 2007. Manual Técnico: Buenas Prácticas Agrícolas en la Producción de Tomate Bajo Condiciones Protegidas. FAO, Gobernación de Antioquia, Mana, Corpoica, Centro de Investigación "La Selva".
- Jetiyanon, K., Plianbangchang, P. 2010. Dose-responses of *Bacillus cereus* RS87 for growth enhancement in various Thai rice cultivars. *Can J Microbiol*, 56(12), 1011-9.
- Jetiyanon, K., Wittaya-Areekul, S., Plianbangchang, P. 2008. Film coating of seeds with *Bacillus cereus* RS87 spores for early plant growth enhancement. *Canadian Journal of Microbiology*, 54(10), 861-867.
- Johnson, D.C., Dos Santos, P.C., Dean, D.R. 2005. NifU and NifS are required for the maturation of nitrogenase and cannot replace the function of isc-gene products in *Azotobacter vinelandii*. *Biochem Soc Trans*, 33(Pt 1), 90-3.
- Jung, J., Yu, K.O., Ramzi, A.B., Choe, S.H., Kim, S.W., Han, S.O. 2012. Improvement of surfactin production in *Bacillus subtilis* using synthetic wastewater by overexpression of specific extracellular signaling peptides, comX and phrC. *Biotechnol Bioeng*, 109(9), 2349-56.
- Katoh, K., Standley, D.M. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol*, 30.
- Kavino, M., Harish, S., Kumar, N., Saravanakumar, D., Samiyappan, R. 2010. Effect of chitinolytic PGPR on growth, yield and physiological attributes of banana (*Musa* spp.) under field conditions. *Applied Soil Ecology*, 45(2), 71-77.
- Kearns, D., Chu, F., Rudner, R., Losick, R. 2004. Genes governing swarming in *Bacillus subtilis* and evidence for a phase variation mechanism controlling surface motility. *Mol Microbiol*, 52.
- Kearns, D.B. 2010. A field guide to bacterial swarming motility. *Nat Rev Micro*, 8(9), 634-644.
- Keeven, J and De Cicco, B.C. 1989. Selective Medium for *Pseudomonas aeruginosa* That Uses 1,10-Phenanthroline as the Selective Agent. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(12), 3231-3233.
- Kennedy, A., 1999, Bacterial diversity in agroecosystems, Agriculture, *Ecosystems & Environment*, 74 (1-3), 65-76.
- Khalid, A., Arshad, M., Zahir, Z.A. 2004. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *J Appl Microbiol*, 96(3), 473-80.
- Kim, K.Y., McDonald, G.A., Jordan, D. 1997. Solubilization of hydroxyapatite by *Enterobacter agglomerans* and cloned *Escherichia coli* in culture medium. *Biology and Fertility of Soils*, 24(4), 347-352.
- Kimura, S., Sinha, N. 2008. Tomato (*Solanum lycopersicum*): A Model Fruit-Bearing Crop. *CSH Protoc*, 2008, pdb.emo105.
- Kinsella, K., Schulthess, C.P., Morris, T.F., Stuart, J.D. 2009. Rapid quantification of *Bacillus subtilis* antibiotics in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(2), 374-379.
- Kinsinger, R.F., Shirk, M.C., Fall, R. 2003. Rapid surface motility in *Bacillus subtilis* is dependent on extracellular surfactin and potassium ion. *J Bacteriol*, 185(18), 5627-31.
- Knudsen, G.R., Dandurand, L.-M. 2007. Analysis of spatial patterns of rhizoplane colonization. in: *The Spatial Distribution of Microbes in the Environment*, (Eds.) F. R.B., M. A.L., Springer. Dordrecht, The Netherlands, pp. 109-133.

- Koberl, M., Dita, M., Martinuz, A., Staver, C., Berg, G. 2015. Agroforestry leads to shifts within the gammaproteobacterial microbiome of banana plants cultivated in Central America. *Front Microbiol*, 6, 91.
- Kokalis-Burelle, N., Kloepper, J.W., Reddy, M.S. 2006. Plant growth-promoting rhizobacteria as transplant amendments and their effects on indigenous rhizosphere microorganisms. *Applied Soil Ecology*, 31(1-2), 91-100.
- Koumoutsis, A., Chen, X.H., Henne, A., Liesegang, H., Hitzeroth, G., Franke, P., Vater, J., Borriss, R. 2004. Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. *J Bacteriol*, 186.
- Kozyrovska, N., Kovtunovych, G., Gromosova, E., Kuharchuk, P., Kordyum, V. 1996. Novel inoculants for an environmentally-friendly crop production. *Resources, Conservation and Recycling*, 18(1-4), 79-85.
- Krimi, Z., Alim, D., Djellout, H., Tafifet, L., Mohamed-Mahmoud, F., Raio, A. 2016. Bacterial endophytes of weeds are effective biocontrol agents of *Agrobacterium* spp., *Pectobacterium* spp., and promote growth of tomato plants. *Phytopathologia Mediterranea; Vol 55, No 2 (2016)*.
- Krober, M., Wibberg, D., Grosch, R., Eikmeyer, F., Verwaaijen, B., Chowdhury, S.P., Hartmann, A., Puhler, A., Schluter, A. 2014. Effect of the strain *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 on the microbial community in the rhizosphere of lettuce under field conditions analyzed by whole metagenome sequencing. *Front Microbiol*, 5, 252.
- Krzywinski, M., Schein, J., Birol, I., Connors, J., Gascoyne, R., Horsman, D., Jones, S.J., Marra, M.A. 2009. Circos: an information aesthetic for comparative genomics. *Genome Res*, 19.
- Kumar, A., Prakash, A., Johri, B.N. 2011. *Bacillus as PGPR in Crop Ecosystem*.
- Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A.M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M.G., Bessieres, P., Bolotin, A., Borchert, S., Borriss, R., Boursier, L., Brans, A., Braun, M., Brignell, S.C., Bron, S., Brouillet, S., Bruschi, C.V., Caldwell, B., Capuano, V., Carter, N.M., Choi, S.K., Codani, J.J., Connerton, I.F., Cummings, N.J., Daniel, R.A., Denizot, F., Devine, K.M., Dusterhoft, A., Ehrlich, S.D., Emmerson, P.T., Entian, K.D., Errington, J., Fabret, C., Ferrari, E., Foulger, D., Fritz, C., Fujita, M., Fujita, Y., Fuma, S., Galizzi, A., Galleron, N., Ghim, S.Y., Glaser, P., Goffeau, A., Golightly, E.J., Grandi, G., Guiseppi, G., Guy, B.J., Haga, K., Haiech, J., Harwood, C.R., Henaut, A., Hilbert, H., Holsappel, S., Hosono, S., Hullo, M.F., Itaya, M., Jones, L., Joris, B., Karamata, D., Kasahara, Y., Klaerr-Blanchard, M., Klein, C., Kobayashi, Y., Koetter, P., Koningstein, G., Krogh, S., Kumano, M., Kurita, K., Lapidus, A., Lardinois, S., Lauber, J., Lazarevic, V., Lee, S.M., Levine, A., Liu, H., Masuda, S., Mael, C., Medigue, C., Medina, N., Mellado, R.P., Mizuno, M., Moestl, D., Nakai, S., Noback, M., Noone, D., O'Reilly, M., Ogawa, K., Ogiwara, A., Oudega, B., Park, S.H., Parro, V., Pohl, T.M., Portetelle, D., Porwollik, S., Prescott, A.M., Presecan, E., Pujic, P., Purnelle, B., et al. 1997. The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*, 390(6657), 249-256.
- Kyselkova, M., Kopecky, J., Frapolli, M., Defago, G., Sagova-Mareckova, M., Grundmann, G.L., Moenne-Loccoz, Y. 2009. Comparison of rhizobacterial community composition in soil suppressive or conducive to tobacco black root rot disease. *Isme j*, 3(10), 1127-38.
- Labuschagne, N., Pretorius, T., Idris, A.H. 2011. Plant Growth Promoting Rhizobacteria as Biocontrol Agents Against Soil-Borne Plant Diseases. in: *Plant Growth and Health Promoting Bacteria*, (Ed.) D.K. Maheshwari, Springer Berlin Heidelberg. Berlin, Heidelberg, pp. 211-230.

- Lanfear, R., Calcott, B., Kainer, D., Mayer, C., Stamatakis, A. 2014. Selecting optimal partitioning schemes for phylogenomic datasets. *BMC Evolutionary Biology*, 14(1), 1-14.
- Leveau, J.H.J. 2007. The magic and menace of metagenomics: prospects for the study of plant growth-promoting rhizobacteria. *European Journal of Plant Pathology*, 119(3), 279-300.
- Li, X.-X., Liu, Q., Liu, X.-M., Shi, H.-W., Chen, S.-F. 2016. Using synthetic biology to increase nitrogenase activity. *Microbial Cell Factories*, 15(1), 43.
- Liaqat, F., Eltem, R. 2016. Identification and characterization of endophytic bacteria isolated from *in vitro* cultures of peach and pear rootstocks. *3 Biotech*, 6(2), 120.
- Lin, L., Guo, W., Xing, Y., Zhang, X., Li, Z., Hu, C., Li, S., Li, Y., An, Q. 2012. The actinobacterium *Microbacterium* sp 16SH accepts pBBR1-based pPROBE vectors, forms biofilms, invades roots, and fixes N₂ associated with micropropagated sugarcane plants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(3), 1185-1195.
- Lindow, S.E., Brandl, M.T. 2003. Microbiology of the phyllosphere. *Appl Environ Microbiol*, 69(4), 1875-83.
- Liu, H., Yin, S., An, L., Zhang, G., Cheng, H., Xi, Y., Cui, G., Zhang, F., Zhang, L. 2016. Complete genome sequence of *Bacillus subtilis* BSD-2, a microbial germicide isolated from cultivated cotton. *Journal of Biotechnology*, 230, 26-27.
- Liu, W.T., Mirzabekov, A.D., Stahl, D.A. 2001. Optimization of an oligonucleotide microchip for microbial identification studies: a non-equilibrium dissociation approach. *Environ Microbiol*, 3(10), 619-29.
- Liu, X.M., Zhao, H.X., Chen, S.F. 2006. Colonization of maize and rice plants by strain *Bacillus megaterium* C4. *Current Microbiology*, 52(3), 186-190.
- Logares, R., Haverkamp, T.H.A., Kumar, S., Lanzén, A., Nederbragt, A.J., Quince, C., Kausrud, H. 2012. Environmental microbiology through the lens of high-throughput DNA sequencing: Synopsis of current platforms and bioinformatics approaches. *Journal of Microbiological Methods*, 91(1), 106-113.
- Lopez, B.R., Bashan, Y., Bacilio, M. 2011. Endophytic bacteria of *Mammillaria fraileana*, an endemic rock-colonizing cactus of the southern Sonoran Desert. *Archives of Microbiology*, 193(7), 527-541.
- López, D., Vlamakis, H., Losick, R., Kolter, R. 2009. Paracrine signaling in a bacterium. *Genes & Development*, 23(14), 1631-1638.
- Loy, A., Maixner, F., Wagner, M., Horn, M. 2007. probeBase—an online resource for rRNA-targeted oligonucleotide probes: new features 2007. *Nucleic Acids Research*, 35(Database issue), D800-D804.
- Lucy, M., Reed, E., Glick, B.R. 2004. Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 86(1), 1-25.
- Lugtenberg, B., Kamilova, F. 2009. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 63, 541-556.
- Luo, C., Liu, X., Zhou, X., Guo, J., Truong, J., Wang, X., Zhou, H., Li, X., Chen, Z. 2015. Unusual Biosynthesis and Structure of Locillomycins from *Bacillus subtilis* 916. *Appl Environ Microbiol*, 81(19), 6601-9.
- Luo, R., Liu, B., Xie, Y., Li, Z., Huang, W., Yuan, J., He, G., Chen, Y., Pan, Q., Liu, Y., Tang, J., Wu, G., Zhang, H., Shi, Y., Yu, C., Wang, B., Lu, Y., Han, C., Cheung, D.W., Yiu, S.M., Peng, S., Xiaoqian, Z., Liu, G., Liao, X., Li, Y., Yang, H., Wang, J., Lam, T.W. 2012. SOAPdenovo2: an empirically improved memory-efficient short-read de novo assembler. *Gigascience*, 1(1), 18.
- Majeed, A., Abbasi, M.K., Hameed, S., Imran, A., Rahim, N. 2015. Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria from wheat rhizosphere and their effect on plant growth promotion. *Frontiers in Microbiology*, 6, 198.

- Marchler-Bauer, A., Lu, S., Anderson, J.B., Chitsaz, F., Derbyshire, M.K., DeWeese-Scott, C., Fong, J.H., Geer, L.Y., Geer, R.C., Gonzales, N.R., Gwadz, M., Hurwitz, D.I., Jackson, J.D., Ke, Z., Lanczycki, C.J., Lu, F., Marchler, G.H., Mullokandov, M., Omelchenko, M.V., Robertson, C.L., Song, J.S., Thanki, N., Yamashita, R.A., Zhang, D., Zhang, N., Zheng, C., Bryant, S.H. 2011. CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Res*, 39(Database issue), D225-9.
- Mendes, R., Garbeva, P., Raaijmakers, J.M. 2013. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(5), 634-663.
- Mia, M.A.B., Shamsuddin, Z.H., Wahab, Z., Marziah, M. 2010. Rhizobacteria as bioenhancer and biofertilizer for growth and yield of banana (*Musa* spp. cv. 'Berangan'). *Scientia Horticulturae*, 126(2), 80-87.
- Mielich-Suss, B., Lopez, D. 2015. Molecular mechanisms involved in *Bacillus subtilis* biofilm formation. *Environ Microbiol*, 17(3), 555-65.
- Millet, Y.A., Danna, C.H., Clay, N.K., Songnuan, W., Simon, M.D., Werck-Reichhart, D., Ausubel, F.M. 2010. Innate Immune Responses Activated in *Arabidopsis* Roots by Microbe-Associated Molecular Patterns. *The Plant Cell*, 22(3), 973-990.
- Monteiro, S.M., Clemente, J.J., Henriques, A.O., Gomes, R.J., Carrondo, M.J., Cunha, A.E. 2005. A procedure for high-yield spore production by *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Progress*, 21(4), 1026-1031.
- Moszer, I. 1998. The complete genome of *Bacillus subtilis*: from sequence annotation to data management and analysis. *FEBS Letters*, 430(1-2), 28-36.
- Moter, A., Gobel, U.B. 2000. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 41(2), 85-112.
- Msogoya, T., Kanyagha, H., Mutigitu, J., Kulebelwa, M., Mamiro, D.P. 2012. Identification and management of microbial contaminants of banana *in vitro* cultures. *J Appl Biol*, 55, 3987-3994.
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. 15(3), 473-497.
- Murphy, J., Riley, J.P. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta*, 27, 31-36.
- Mwajita, M.R., Murage, H., Tani, A., Kahangi, E.M. 2013. Evaluation of rhizosphere, rhizoplane and phyllosphere bacteria and fungi isolated from rice in Kenya for plant growth promoters. *SpringerPlus*, 2, 606.
- Mwangi, A.M.K., Kahangi, E.M., Ateka, E., Onguso, J., Mukhongo, R.W., Mwangi, E.K., Jefwa, J.M. 2013. Growth effects of microorganisms based commercial products inoculated to tissue cultured banana cultivated in three different soils in Kenya. *Applied Soil Ecology*, 64, 152-162.
- Nakamura, L.K., Roberts, M.S., Cohan, F.M. 1999. Relationship of *Bacillus subtilis* clades associated with strains 168 and W23: a proposal for *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* subsp. nov. and *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* subsp. nov. *Int J Syst Bacteriol*, 56(Pt 3), 1211-5.
- Nakano, M.M., Zuber, P. 1998. Anaerobic growth of a "strict aerobe" (*Bacillus subtilis*). *Annu Rev Microbiol*, 52, 165-90.
- Nederbragt, A.J., Rounge, T.B., Kausrud, K.L., Jakobsen, K.S. 2010. Identification and quantification of genomic repeats and sample contamination in assemblies of 454 pyrosequencing reads. *Sequencing*, 2010.
- Nihorimbere, V., Cawoy, H., Seyer, A., Brunelle, A., Thonart, P., Ongena, M. 2012. Impact of rhizosphere factors on cyclic lipopeptide signature from the plant beneficial strain *Bacillus amyloliquefaciens* S499. *Fems Microbiology Ecology*, 79(1).

- Nihorimbere, V., Fickers, P., Thonart, P., Ongena, M. 2009. Ecological fitness of *Bacillus subtilis* BGS3 regarding production of the surfactin lipopeptide in the rhizosphere. *Environmental Microbiology Reports*, 1(2), 124-130.
- Nishito, Y., Osana, Y., Hachiya, T., Pependorf, K., Toyoda, A., Fujiyama, A., Itaya, M., Sakakibara, Y. 2010. Whole genome assembly of a natto production strain *Bacillus subtilis* natto from very short read data. *BMC Genomics*, 11, 243.
- Nunes-Halldorson, V.D., Duran, N.L. 2003. Bioluminescent bacteria: Lux genes as environmental biosensors. *Brazilian Journal of Microbiology*, 34(2), 91-96.
- Ongena, M., Jacques, P. 2008. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol*, 16.
- Ongena, M., Jacques, P., Touré, Y., Destain, J., Jabrane, A., Thonart, P. 2005. Involvement of fengycin-type lipopeptides in the multifaceted biocontrol potential of *Bacillus subtilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69(1), 29-38.
- Ongena, M., Jourdan, E., Adam, A., Paquot, M., Brans, A., Joris, B., Arpigny, J.L., Thonart, P. 2007. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environmental microbiology*, 9(4), 1084-1090.
- Oslizlo, A., Stefanic, P., Dogsa, I., Mandic-Mulec, I. 2014. Private link between signal and response in *Bacillus subtilis* quorum sensing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(4), 1586-1591.
- Oslizlo, A., Stefanic, P., Vatovec, S., Beigot Glaser, S., Rupnik, M., Mandic-Mulec, I. 2015. Exploring ComQXPA quorum-sensing diversity and biocontrol potential of *Bacillus* spp. isolates from tomato rhizosphere. *Microbial Biotechnology*, 8(3), 527-540.
- Owen, D., Williams, A.P., Griffith, G.W., Withers, P.J.A. 2015. Use of commercial bio-inoculants to increase agricultural production through improved phosphorus acquisition. *Applied Soil Ecology*, 86, 41-54.
- O'Callaghan, M. 2016. Microbial inoculation of seed for improved crop performance: issues and opportunities. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1-18.
- Pandey, A., Palni, L.M.S. 1997. *Bacillus* species: The dominant bacteria of the rhizosphere of established tea bushes. *Microbiological Research*, 152(4), 359-365.
- Park, M., Kim, C., Yang, J., Hyoungseok L., Wansik S., Seunghwan K., Tongmin S., 2005. Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. *Microbiological Research*, 160, 127-133.
- Patten, C.L., Glick, B.R. 2002. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(8), 3795-3801.
- Pertot, I., Puopolo, G., Hosni, T., Pedrotti, L., Jourdan, E., Ongena, M. 2013. Limited impact of abiotic stress on surfactin production in planta and on disease resistance induced by *Bacillus amyloliquefaciens* S499 in tomato and bean. *FEMS Microbiol Ecol*, 86(3), 505-19.
- Peypoux, F., Bonmatin, J.M., Wallach, J. 1999. Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Appl Microbiol Biotechnol*, 51(5), 553-63.
- Piromyong, P., Buranabanyat, B., Tantasawat, P., Tittabutr, P., Boonkerd, N., Teaumroong, N. 2011. Effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) inoculation on microbial community structure in rhizosphere of forage corn cultivated in Thailand. *European Journal of Soil Biology*, 47(1), 44-54.
- Pependorf, K., Tsuyoshi, H., Osana, Y., Sakakibara, Y. 2010. Murasaki: A Fast, Parallelizable Algorithm to Find Anchors from Multiple Genomes. *PLOS ONE*, 5(9), e12651.
- Porcel, R., Zamarréño, Á., García-Mina, J., Aroca, R. 2014. Involvement of plant endogenous ABA in *Bacillus megaterium* PGPR activity in tomato plants. *BMC Plant Biology* 14 - 36, 14(1), 1-12.

- Posada, L.F., Alvarez, J.C., Hu, C.-H., de-Bashan, L.E., Bashan, Y. 2016a. Construction of probe of the plant growth-promoting bacteria *Bacillus subtilis* useful for fluorescence *in situ* hybridization. *Journal of Microbiological Methods*, 128, 125-129.
- Posada, L.F., Ramírez, M., Ochoa-Gómez, N., Cuellar-Gaviria, T.Z., Argel-Roldan, L.E., Ramírez, C.A., Villegas-Escobar, V. 2016b. Bioprospecting of aerobic endospore-forming bacteria with biotechnological potential for growth promotion of banana plants. *Scientia Horticulturae*, 212, 81-90.
- Posada-Uribe, L., Romero-Tabarez, M., Villegas-Escobar, V. 2015. Effect of medium components and culture conditions in *Bacillus subtilis* EA-CB0575 spore production. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 1-10.
- Prashar, P., Shah, S. 2016. Impact of Fertilizers and Pesticides on Soil Microflora in Agriculture. in: *Sustainable Agriculture Reviews: Volume 19*, (Ed.) E. Lichtfouse, Springer International Publishing. Cham, pp. 331-361.
- Qi, G., Kang, Y., Li, L., Xiao, A., Zhang, S., Wen, Z., Xu, D., Chen, S. 2014. Deletion of meso-2,3-butanediol dehydrogenase gene *budC* for enhanced D-2,3-butanediol production in *Bacillus licheniformis*. *Biotechnol Biofuels*, 7(1), 16.
- Quambusch, M., Pirttilä, A.M., Tejesvi, M.V., Winkelmann, T., Bartsch, M. 2014. Endophytic bacteria in plant tissue culture: differences between easy- and difficult-to-propagate *Prunus avium* genotypes. *Tree Physiology*.
- Raaijmakers, J.M., De Bruijn, I., Nybroe, O., Ongena, M. 2010. Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiol Rev*, 34(6), 1037-62.
- Raaijmakers, J.M., Paulitz, T.C., Steinberg, C., Alabouvette, C., Moenne-Loccoz, Y. 2009. The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant and Soil*, 321(1-2), 341-361.
- Rai, N., Rai, R., Venkatesh, K.V. 2015. Quorum Sensing in Competence and Sporulation. in: *Quorum Sensing vs Quorum Quenching: A Battle with No End in Sight*, (Ed.) C.V. Kalia, Springer India. New Delhi, pp. 61-64.
- Rambaut, A. 2014. FigTree 1.4.1. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.
- Ramirez, C.A., Klopper, J.W. 2010. Plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 depends on inoculum rate and P-related soil properties. *Biology and Fertility of Soils*, 46(8), 835-844.
- Ramirez-Puebla, S.T., Servin-Garciduenas, L.E., Jimenez-Marin, B., Bolanos, L.M., Rosenblueth, M., Martinez, J., Rogel, M.A., Ormeno-Orrillo, E., Martinez-Romero, E. 2013. Gut and root microbiota commonalities. *Appl Environ Microbiol*, 79(1), 2-9.
- Ramírez C, M. 2012. Bacterias rizosféricas formadoras de endospora en *Musa* spp. bajo diferentes manejos agronómicos y su potencial para promover crecimiento vegetal. in: Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Vol. Magister en Biología, Universidad de Antioquia. Medellín.
- Reva, O.N., Dixelius, C., Meijer, J., Priest, F.G. 2004. Taxonomic characterization and plant colonizing abilities of some bacteria related to *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*. *Fems Microbiology Ecology*, 48(2).
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A., Huelsenbeck, J.P. 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst Biol*, 61(3), 539-42.
- Rooney, A.P., Price, N.P., Ehrhardt, C., Swezey, J.L., Bannan, J.D. 2009. Phylogeny and molecular taxonomy of the *Bacillus subtilis* species complex and description of *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* subsp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 59(Pt 10), 2429-36.

- Roongsawang, N., Washio, K., Morikawa, M. 2010. Diversity of nonribosomal peptide synthetases involved in the biosynthesis of lipopeptide biosurfactants. *Int J Mol Sci*, 12(1), 141-72.
- Rosenberg Eugene , Zilber-Rosenberg , I. 2016. Microbes drive evolution of animals and plants: the hologenome concept. *American Society of Microbiology*, 7(2).
- Rossmann, B., Muller H Fau - Smalla, K., Smalla K Fau - Mpiira, S., Mpiira S Fau - Tumuhairwe, J.B., Tumuhairwe Jb Fau - Staver, C., Staver C Fau - Berg, G., Berg, G. 2012. Banana-associated microbial communities in Uganda are highly diverse but dominated by Enterobacteriaceae. (1098-5336 (Electronic)).
- Ruckert, C., Blom, J., Chen, X.H., Reva, O., Borriss, R. 2011. Genome sequence of *B. amyloliquefaciens* type strain DSM7(T) reveals differences to plant-associated *B. amyloliquefaciens* FZB42. *J Biotechnol*, 155.
- Rudrappa, T., Biedrzycki, M.L., Bais, H.P. 2008a. Causes and consequences of plant-associated biofilms. *FEMS Microbiol Ecol*, 64(2), 153-66.
- Rudrappa, T., Czymmek, K.J., Pare, P.W., Bais, H.P. 2008b. Root-secreted malic acid recruits beneficial soil bacteria. *Plant Physiol*, 148.
- Saile, E., Koehler, T.M. 2006. *Bacillus anthracis* multiplication, persistence, and genetic exchange in the rhizosphere of grass plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(5), 3168-3174.
- Salzman, N.H., de Jong, H., Paterson, Y., Harmsen, H.J., Welling, G.W., Bos, N.A. 2002. Analysis of 16S libraries of mouse gastrointestinal microflora reveals a large new group of mouse intestinal bacteria. *Microbiology*, 148(Pt 11), 3651-60.
- Schmidt, R., Köberl, M., Mostafa, A., Ramadan, E. M., Monschein, M., Jensen, K. B., Berg, G. 2014. Effects of bacterial inoculants on the indigenous microbiome and secondary metabolites of chamomile plants. *Frontiers in Microbiology*, 5, 64.
- Schwyn, B., Neilands, J.B. 1987. Universal Chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*, 160(1), 47-56.
- Sella, S.R.B.R., Vandenberghe, L.P.S., Socol, C.R. 2014. Life cycle and spore resistance of spore-forming *Bacillus atrophaeus*. *Microbiological Research*, 169(12), 931-939.
- Setlow, P. 2014. Germination of spores of *Bacillus* species: what we know and do not know. *J Bacteriol*, 196(7), 1297-305.
- Sharma, A., Satyanarayana, T. 2013. Comparative Genomics of *Bacillus* species and its Relevance in Industrial Microbiology. *Genomics Insights*, 6, 25-36.
- Siezen, R.J., Van Hijum, S.A.F.T. 2010. Genome (re-)annotation and open-source annotation pipelines. *Microbial biotechnology*, 3(4), 362-369.
- Singh, D.P., Prabha, R., Yandigeri, M.S., Arora, D.K. 2011. Cyanobacteria-mediated phenylpropanoids and phytohormones in rice (*Oryza sativa*) enhance plant growth and stress tolerance. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 100(4), 557-568.
- Smith, J.L., Goldberg, J.M., Grossman, A.D. 2014. Complete Genome Sequences of *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* Laboratory Strains JH642 (AG174) and AG1839. *Genome Announcements*, 2(4).
- Stein, L., Mungall, C., Shu, S., Caudy, M., Mangone, M., Day, A., Nickerson, E., Stajich, J., Harris, T., Arva, A., Lewis, S. 2002. The generic genome browser: a building block for a model organism system database. *Genome Res*, 12.
- Stein, T. 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*, 56(4), 845-857.
- Stephenson, S.J., Perego, M. 2002. Interaction surface of the Spo0A response regulator with the Spo0E phosphatase. *Mol Microbiol*, 44(6), 1455-67.

- Sukumaran, J., Holder, M.T. 2010. DendroPy: a Python library for phylogenetic computing. *Bioinformatics*, 26(12), 1569-71.
- Sørensen, J., Jensen, L., Nybroe, O. 2001. Soil and rhizosphere as habitats for *Pseudomonas* inoculants: new knowledge on distribution, activity and physiological state derived from micro-scale and single-cell studies. *Plant and Soil*, 232(1-2), 97-108.
- Tan, S., Ramamurthi, K.S. 2014. Spore formation in *Bacillus subtilis*. 6(3), 212-225.
- Tan, S., Yang, C., Mei, X., Shen, S., Raza, W., Shen, Q., Xu, Y. 2013. The effect of organic acids from tomato root exudates on rhizosphere colonization of *Bacillus amyloliquefaciens* T-5. *Applied Soil Ecology*, 64, 15-22.
- Taulé, C., Castillo, A., Villar, S., Olivares, F., Battistoni, F. 2016. Endophytic colonization of sugarcane (*Saccharum officinarum*) by the novel diazotrophs *Shinella* sp. UYSO24 and *Enterobacter* sp. UYSO10. *Plant and Soil*, 403(1), 403-418.
- Teira, E., Reinthaler, T., Pernthaler, A., Pernthaler, J., Herndl, G.J. 2004. Combining Catalyzed Reporter Deposition-Fluorescence *In Situ* Hybridization and Microautoradiography To Detect Substrate Utilization by Bacteria and Archaea in the Deep Ocean. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(7), 4411-4414.
- Thomas, P., Sekhar C., 2016. Cultivation Versus Molecular Analysis of Banana (*Musa* sp.) Shoot-Tip Tissue Reveals Enormous Diversity of Normally Uncultivable Endophytic Bacteria, *Microbial Ecology*, doi: 10.1007/s00248-0160877-7.
- Toure, Y., Ongena, M., Jacques, P., Guiro, A., Thonart, P. 2004. Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. *J Appl Microbiol*, 96(5), 1151-60.
- Toyota, K. 2015. *Bacillus*-related Spore Formers: Attractive Agents for Plant Growth Promotion. *Microbes and Environments*, 30(3), 205-207.
- Trabelsi, D., Mhamdi, R. 2013. Microbial inoculants and their impact on soil microbial communities: a review. *Biomed Res Int*, 2013, 863240.
- Turnbull, P. 1996. *Bacillus*. 4th edition ed. in: *Medical Microbiology*, (Ed.) Baron S, University of Texas Medical Branch at Galveston. Galveston (TX).
- Turnbull, P.C.B., Frawley, D.A., Bull, R.L. 2007. Heat activation/shock temperatures for *Bacillus anthracis* spores and the issue of spore plate counts versus true numbers of spores. *Journal of Microbiological Methods*, 68(2), 353-357.
- Tóthmérés, B. 1995. Comparison of different methods for diversity ordering. *Journal of Vegetation Science*, 6(2), 283-290.
- Ugoji, E.O., Laing, M.D., Hunter, C.H. 2005. Colonization of *Bacillus* spp. on seeds and in plant rhizoplane. *Journal of Environmental Biology*, 26(3), 459-466.
- Ulyanova, V., Shah Mahmud, R., Malanin, S., Vershinina, V., Ilinskaya, O. 2016. Improving *Bacillus altitudinis* B-388 Genome Scaffolding Using Mate-Pair Next-Generation Sequencing. *BioNanoScience*, 1-3.
- Vaikuntapu, P.R., Dutta, S., Samudrala, R.B., Rao, V.R.V.N., Kalam, S., Podile, A.R. 2014. Preferential Promotion of *Lycopersicon esculentum* (Tomato) Growth by Plant Growth Promoting Bacteria Associated with Tomato. *Indian Journal of Microbiology*, 54(4), 403-412.
- Veening, J.W., Kuipers, O.P., Brul, S., Hellingwerf, K.J., Kort, R. 2006. Effects of phosphorelay perturbations on architecture, sporulation, and spore resistance in biofilms of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 188(8), 3099-3109.
- Vessey, J.K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, 255(2), 571-586.
- Vestberg, M., Cassells, A.C. 2009. The Use of AMF and PGPR inoculants singly and combined to promote microplant establishment, growth and health. in: *Symbiotic Fungi: Principles*

- and Practice, (Eds.) A. Varma, A.C. Kharkwal, Springer Berlin Heidelberg. Berlin, Heidelberg, pp. 337-360.
- Vilain, S., Luo, Y., Hildreth, M.B., Brozel, V.S. 2006. Analysis of the life cycle of the soil saprophyte *Bacillus cereus* in liquid soil extract and in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(7).
- Villegas-Escobar, V. 2012. Identificación y caracterización de extractos biológicamente activos contra patógenos de *Musa* sp. in: Facultad de Ciencias, Vol. Doctor en Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá. Medellín, Colombia, pp. 181.
- Villegas-Escobar, V., Ceballos, I., Mira, J.J., Argel, L.E., Orduz Peralta, S., Romero-Tabarez, M. 2013. Fengycin C Produced by *Bacillus subtilis* EA-CB0015. *J Nat Prod*.
- Vincent, A.T., Derome, N., Boyle, B., Culley, A.I., Charette, S.J. 2016. Next-generation sequencing (NGS) in the microbiological world: How to make the most of your money. *Journal of Microbiological Methods*.
- VKM. 2013. Risk assessment of the biological plant protection product Serenade ASO, with the organism *Bacillus subtilis* QST 713. Opinion of the Panel on Plant Protection Products of the Norwegian Scientific Committee for Food Safety. VKM.
- Vlamakis, H., Aguilar, C., Losick, R., Kolter, R. 2008. Control of cell fate by the formation of an architecturally complex bacterial community. *Genes Dev*, 22.
- Vlamakis, H., Chai, Y., Beaugregard, P., Losick, R., Kolter, R. 2013. Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. *Nat Rev Micro*, 11(3), 157-168.
- Větrovský, T., Baldrian, P. 2013. The Variability of the 16S rRNA Gene in Bacterial Genomes and Its Consequences for Bacterial Community Analyses. *PLOS ONE*, 8(2), e57923.
- Wallner, G., Amann, R., Beisker, W. 1993. Optimizing fluorescent *in situ* hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry*, 14(2), 136-43.
- Wang, L.T., Lee, F.L., Tai, C.J., Kuo, H.P. 2008. *Bacillus velezensis* is a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 58(Pt 3), 671-5.
- Waters, C.M., Bassler, B.L. 2005. Quorum sensing: Cell-to-cell communication in bacteria. in: *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, Vol. 21, Annual Reviews. Palo Alto, pp. 319-346.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol*, 173(2), 697-703.
- Wernersson, R., Pedersen, A.G. 2003. RevTrans: Multiple alignment of coding DNA from aligned amino acid sequences. *Nucleic Acids Res*, 31(13), 3537-9.
- Wipat, A., Harwood, C.R. 1999. The *Bacillus subtilis* genome sequence: the molecular blueprint of a soil bacterium. *FEMS Microbiology Ecology*, 28(1), 1-9.
- Wu, L.J., Errington, J. 2002. A large dispersed chromosomal region required for chromosome segregation in sporulating cells of *Bacillus subtilis*. *The EMBO Journal*, 21(15), 4001-4011.
- Xiao-ying, G., Chun-e, H., Tao, L., Zhu, O. 2015. Effect of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens* on Growth of Greenhouse Tomato and Rhizosphere Microbial Community. *Journal of Northeast Agricultural University (English Edition)*, 22(3), 32-42.
- Yilmaz, P., Parfrey, L.W., Yarza, P., Gerken, J., Priesse, E., Quast, C., Schweer, T., Peplies, J., Ludwig, W., Glöckner, F.O. 2013. The SILVA and "All-species Living Tree Project (LTP)" taxonomic frameworks. *Nucleic Acids Research*.
- Young, C.S., Lethbridge, G., Shaw, L.J., Burns, R.G. 1995. Survival of inoculated *Bacillus cereus* spores and vegetative cells in non-planted and rhizosphere soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 27(8), 1017-1026.
- Yuan, J., Ruan, Y., Wang, B., Zhang, J., Waseem, R., Huang, Q., Shen, Q. 2013. Plant growth-promoting rhizobacteria strain *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6-enriched bio-organic

- fertilizer suppressed *Fusarium* wilt and promoted the growth of banana plants. *J Agric Food Chem*, 61(16), 3774-80.
- Yuan, J., Zhang, N., Huang, Q., Raza, W., Li, R., Vivanco, J.M., Shen, Q. 2015. Organic acids from root exudates of banana help root colonization of PGPR strain *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6. *Scientific Reports*, 5, 13438.
- Zeigler, D.R., Prágai, Z., Rodriguez, S., Chevreux, B., Muffler, A., Albert, T., Perkins, J.B. 2008. The origins of 168, W23, and other *Bacillus subtilis* legacy strains. *Journal of bacteriology*, 190(21), 6983-6995.
- Zerbino, D.R., Birney, E. 2008. Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Res*, 18(5), 821-9.
- Zhang, L., Khabbaz, S.E., Wang, A., Li, H., Abbasi, P.A. 2015. Detection and characterization of broad-spectrum antipathogen activity of novel rhizobacterial isolates and suppression of *Fusarium* crown and root rot disease of tomato. *Journal of Applied Microbiology*, 118(3), 685-703.
- Zhang, N., Wang, D.D., Liu, Y.P., Li, S.Q., Shen, Q.R., Zhang, R.F. 2014. Effects of different plant root exudates and their organic acid components on chemotaxis, biofilm formation and colonization by beneficial rhizosphere-associated bacterial strains. *Plant Soil*, 374.
- Zhao, Y., Sangare, L., Wang, Y., Folly, Y.M.E., Selvaraj, J.N., Xing, F., Zhou, L., Wang, Y., Liu, Y. 2015. Complete genome sequence of *Bacillus subtilis* SG6 antagonistic against *Fusarium graminearum*. *Journal of Biotechnology*, 194, 10-11.
- Zhou, H., Luo, C., Fang, X., Xiang, Y., Wang, X., Zhang, R., Chen, Z. 2016. Loss of GltB Inhibits biofilm formation and biocontrol efficiency of *Bacillus subtilis* Bs916 by altering the production of γ -Polyglutamate and Three Lipopeptides. *PLoS ONE*, 11(5), e0156247.
- Zwirgmaier, K. 2005. Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) - the next generation. *Fems Microbiology Letters*, 246(2), 151-158.